

# **Untersuchungen zum Auftreten apoptotischer Zellen in menschlichen Venen in Abhängigkeit von dem Lagerungsmedium**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Hohen Medizinischen Fakultät  
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität  
Bonn

Christina Gebhart  
aus Bonn  
2011

**Angefertigt mit Genehmigung der  
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn**

**1.Gutachter: Prof. Dr. med. C. J. Preuße  
2.Gutachter: PD Dr. med. L. Pizzulli**

**Tag der Mündlichen Prüfung: 14.10.2011**

**Klinik und Poliklinik für Herzchirurgie der Universität Bonn  
Direktor: Prof. Dr. med. A. Welz**

**Meinen Eltern in Dankbarkeit und Liebe gewidmet**



## Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>7</b>
<b>1. Einleitung.....</b>	<b>8</b>
1.1 Bedeutung und Entwicklung der Koronarchirurgie.....	8
1.2 Morphologische Unterschiede zwischen Venen und Arterien .....	9
1.2.1 Die Vena saphena magna.....	11
1.3 Ursachen der Endothelzellschäden in venösen Grafts.....	11
1.4 Mögliche Vermeidungsstrategien der Endothelzellschäden in venösen Grafts .....	12
1.5 Okklusionsraten venöser und arterieller Grafts .....	12
1.5.1 Die Thrombose.....	13
1.5.2 Die Intimahyperplasie .....	14
1.5.3 Die Arteriosklerose .....	15
1.6 Die Apoptose.....	16
1.7 Die Lösungen Via Span und Z44 .....	19
1.7.1 Die Lösung Via Span .....	19
1.7.2 Die Lösung Z44 .....	20
1.8 Ziel der Arbeit.....	21
<b>2. Material und Methoden.....</b>	<b>22</b>
2.1 Materialgewinnung .....	22
2.1.1 Patientenkollektiv.....	22
2.1.2 Versuchsaufbau .....	22
2.1.3 Versuchsdurchführung .....	22
2.2 Histochemie und Immunhistochemie.....	24
2.2.1 TUNEL-Test .....	24
2.2.2 Durchführung des TUNEL-Testes.....	25
2.2.3 Hämatoxylin-Eosin-Färbung.....	26
2.3 Bestimmung der Morphologie .....	27
2.3.1 Quantitative Bestimmung der Zelldichte .....	27
2.3.2 Quantitative Bestimmung der Expression immunhistochemischer Signale....	28
2.4 Statistische Analyse.....	29

2.5	Geräte und sonstige Materialien.....	30
2.5.1	Chemikalien und Zusatzlösungen für den TUNEL-Test.....	30
2.5.2	Chemikalien und Zusatzlösungen für die Hämatoxylin-Eosin-Färbung.....	30
2.5.3	Geräte und weitere Materialien.....	31
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>34</b>
3.1	Histologische Auswertung .....	34
3.2	Statistik .....	34
3.3	Apoptoseraten in beiden Lösungen.....	35
3.4	Apoptoseraten in den einzelnen Wandschichten.....	38
3.4.1	Endothel .....	38
3.4.2	Subendothel.....	41
3.4.3	Media .....	42
3.4.4	Adventitia.....	45
3.4.5	Gegenüberstellung von Apoptoserate und Kaliumkonzentration der Lösungen.....	47
<b>4.</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>48</b>
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>56</b>
<b>6.</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>58</b>
<b>7.</b>	<b>Danksagung.....</b>	<b>66</b>
<b>8.</b>	<b>Lebenslauf.....</b>	<b>67</b>

## Abkürzungsverzeichnis

ANP	Atriales natriuretisches Peptid
Apaf-1	Apoptotic protease activating factor 1
ATP	Adenosintriphosphat
Bcl-2	B-Cell Lymphoma 2
bFGF	Basic fibroblast growth factor
CARD	Caspase recruitment domain C
DD	Death domain
DED	Death effector domain
DISC	Death inducing signaling complex
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDHF	Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor
FADD	Fas-associating protein with death domain
HDL	High Density Lipoprotein
H.E.	Hämatoxylin-Eosin
HTK	HTK-Lösung nach Bretschneider
IFN	Interferon
IGF-1	Insulin-like growth factor
IL-1	Interleukin-1
IMA	Arteria mammaria interna
NO	Stickstoffmonoxid
PDGF	Platelet derived growth factor
PGI <sub>2</sub>	Prostazyklin
PTCA	Perkutane transluminale koronare Angioplastie
tGF	Transforming growth factor
TNF	Tumor Nekrose Faktor
tPA	tissue plasminogen activator

# 1. Einleitung

## 1.1 Bedeutung und Entwicklung der Koronarchirurgie

Die aortokoronare Bypassoperation ist in Deutschland die am häufigsten durchgeführte Operation in der Herzchirurgie. Jährlich werden etwa 75000 Patienten mit koronarer Herzerkrankung operativ versorgt (Stand 2000). Die aortokoronare Bypassoperation macht damit ca. 75% aller Herzoperationen aus. Als Bypassmaterial stehen neben den arteriellen Grafts autologe Venen, hauptsächlich die Vena saphena magna, zur Verfügung. Diese wird in ca. 95% aller aortokoronaren Bypassoperationen genutzt (Düsterhöft, 2000). Neben der Vena saphena magna werden die Vena saphena parva und im „Notfall“ auch die Vena cephalica verwendet. Als arterielle Grafts werden die Arteria mammaria interna, die Arteria radialis, die Arteria gastroepiploica und die Arteria epigastrica verwendet (Emmrich, 1998).

Die koronare Herzkrankheit ist neben der zerebrovaskulären Insuffizienz und der peripheren arteriellen Verschlusskrankheit eine der häufigsten und bedrohlichsten Manifestationsformen der Arteriosklerose (Emmrich, 1998). Als Risikofaktoren, die die Bildung von arteriosklerotischen Plaques begünstigen, gelten die arterielle Hypertonie, die genetische Prädisposition, der Diabetes mellitus, der Nikotinabusus, die Hypercholesterinämie und das männliche Geschlecht.

Am 23. Mai 1964 wurde die erste aortokoronare Bypassoperation mit der Vena saphena magna durch H.E. Garrett am schlagenden Herzen ohne Einsatz der Herz-Lungen-Maschine vorgenommen, jedoch erst 1973 veröffentlicht (Garrett et al., 1973). Die aortokoronare Bypassoperation mit Einsatz der Herz-Lungen-Maschine, auf der die heute üblichen Operationstechniken basieren, wurde in den Jahren 1967 und 1968 etabliert, wobei die größte Pionierleistung R.G. Favaloro zugesprochen wird (Favaloro, 1969). Die Entwicklung der Herz-Lungen-Maschine durch John H. Gibbon im Jahre 1953 bedeutete einen Meilenstein für die Koronarchirurgie und machte Operationen am nicht schlagenden Herzen erstmals möglich (Gibbon, 1954).

Der erste arterielle Bypass wurde bereits 1964 mit der IMA durchgeführt (Kolessov, 1967).

Ein wesentliches Problem in der Koronarchirurgie stellt die hohe Okklusionsrate der venösen Grafts im Vergleich zu arteriellen Grafts dar.



Die Offenheitsrate in venösen Grafts liegt nach einem Jahr bei 84% und sinkt nach zehn Jahren auf 61% ab. Im Gegensatz dazu liegt die Offenheitsrate der IMA nach zehn Jahren noch bei 85% (Goldman et al., 2004).

## 1.2 Morphologische Unterschiede zwischen Venen und Arterien

*Arterien* bestehen aus drei Wandschichten, Intima, Media und Adventitia. Die Intima grenzt das Lumen nach innen ab und besteht aus einem einschichtigen Endothel, welches sich aus platten, polygonalen Zellen zusammensetzt. Die Endothelzellen sind durch 'tight junctions' miteinander verbunden. Die Media ist die breiteste Schicht der Arterienwand und besteht aus glatten Muskelzellen, die innen longitudinal und außen zirkulär angeordnet sind. Die Adventitia enthält elastische Fasern, Kollagen, Fibroblasten und Proteoglykane.

In den *Venen* lässt sich neben dem Endothel das Subendothel erkennen. Dieses besteht aus Kollagen, vereinzelt glatten Muskelzellen, Fibroblasten und Elastin. Die Endothelzellen sind größer und flacher als in der Arterie und die 'tight junctions' zwischen den Endothelzellen weisen eine höhere Permeabilität auf als die der arteriellen Endothelzellen. Die Media besteht aus longitudinalen und zirkulären Muskelzellen, die mit elastischen und kollagenen Fasern durchsetzt sind. Die Adventitia besteht zum großen Teil aus kollagenen Bündeln, die von elastischen Fasern umgeben sind. Sie ist häufig dicker als die Media und besitzt mehr Vasa vasorum als die Arterien, weshalb die intakte Venenwand eine geringere Vulnerabilität gegenüber ischämischen Schäden aufweist (Cheanvechai et al., 1975).

Von großer Bedeutung sind die Endothelzellen der Gefäße, da sie den vasomotorischen Tonus kontrollieren, die Blutgerinnung beeinflussen, in das Entzündungsgeschehen und die Fibrinolyse eingreifen sowie die Proliferation und Regeneration von vaskulären Gefäßen regulieren. Durch ihre günstige Lage zwischen Blut und Interstitium können sie sowohl intravaskuläre als auch extravaskuläre Vorgänge beeinflussen.

Das Endothel reagiert sehr sensitiv auf Hypoxie, Zytokinexposition, Endotoxin, Nikotin oder iatrogene Schäden in Form von chirurgischer Manipulation. Durch diese Schäden werden die Endothelzellen aktiviert und nehmen am Entzündungsgeschehen teil. Es kommt zur Vasokonstriktion, Koagulation, Leukozytenadhäsion und Proliferation der glatten Muskelzellen (Pober und Cotran, 1990). Diese Reaktionen stellen Schutzmechanismen der Zelle dar.

Wenn diese Stimuli kontinuierlich bestehen, kommt es zu einer übersteigerten Reaktion, die zu Gewebeschaden und geminderter Organfunktion führt (Ross, 1995).

Die Endothelzellen beeinflussen die Blutgerinnung unter anderem durch die Bildung des Thrombomodulins, das an der Oberfläche der Endothelzellen gebildet wird (Verrier und Boyle, 1996).

Weiterhin synthetisieren sie sowohl vasokonstriktorische als auch vasodilatative Mediatoren. Zu den Vasokonstriktoren zählen unter anderem Angiotensin II, Serotonin und Endothelin-1 (Bryan und Angelini, 1994). Wichtige Vasodilatoren sind NO, Adenosin und Prostazyklin (Yang und He, 2005). NO hemmt zugleich die Plättchenaggregation (Radomski et al., 1990; Tsui et al., 2001). Des Weiteren hemmt es die Proliferation glatter Muskelzellen (De Caterina et al., 1995) und induziert die Apoptose in vaskulären Zellen (Nishio et al., 1996). Eine weitere wichtige Funktion des NO ist die Inaktivierung der freien Sauerstoffradikale (Davies et al., 1994). Ebenfalls zu den Vasodilatoren zählt EDHF (Yang und He, 2005).

Wenn Endothelzellen verletzt werden, z.B. im Rahmen der Bypassoperation, produzieren sie Vasokonstriktoren wie Endothelin, Thromboxan A2 und Angiotensin II (Luscher, 1991).

Das Endothel bildet außerdem Wachstumsfaktoren und auch Wachstumsinhibitoren, die die Gefäßwandstruktur bestimmen. Zu den Wachstumsfaktoren gehören das PDGF, das bFGF, das IGF1 und das IL-1. Wichtige Wachstumsinhibitoren, die das Endothel produziert, sind Heparin und Heparin- Sulfat (Luscher et al., 1993).

Tabelle 1 zeigt den Unterschied der Physiologie zwischen Vene und Arterie.

	Vene	Arterie
<b>Elastizität</b>	relativ unelastisch unter arteriellem Druck	elastisch unter arteriellem Druck
<b>Lipolyse</b>	langsam	schnell
<b>Fett Aufnahme</b>	schnell	langsam
<b>Fett Synthese</b>	aktiv	weniger aktiv
<b>PGI<sub>2</sub> Produktion</b>	gering	mehr
<b>Vasokonstriktoren</b>	sensitiv	weniger sensitiv
<b>Vasodilatoren</b>	weniger sensitiv	sensitiv

*Tabelle 1: Physiologie der Vene und Arterie (Cox et al., 1991)*

### 1.2.1 Die Vena saphena magna

Es gibt spezifische Merkmale der Vena saphena magna. Sie besitzt mehr Muskulatur und Elastin als andere Venen. Ca. 1% der nativen Vena saphena magna zeigt bereits vor der Verwendung als venöses Graft eine Stenose von >50% (Hassantash et al., 2008). Bis zu 95% der Menschen im Alter von 60 bis 70 Jahren zeigen eine Intimaverdickung der Vena saphena magna auf Grund vorbestehender Phlebosklerose (Stanley et al., 1973).

### 1.3 Ursachen der Endothelzellschäden in venösen Grafts

Die Schädigung der Endothelzellen in venösen Grafts begünstigt sowohl die Entstehung der Intimahyperplasie mit der Folge einer langfristigen Stenose als auch den frühzeitig thrombotischen Graftverschluss. Die vor der Reperfusion vorherrschende Hypoxie/ Ischämie führt zu Endothelschäden, die reversibel sind, solange die Hypoxie/ Ischämie nur von kurzer Dauer ist. Besteht dieser Zustand länger als 24 Stunden, zeigen bis zu einem Viertel der Endothelzellen apoptotische Veränderungen (Li et al., 1999). Diese Rate steigt nach 48 Stunden auf 55% an (Stempien-Otero et al., 1999). Die Hypoxie entsteht, da die Vene als freies Transplantat genommen wird. Zu den durch Hypoxie/ Ischämie verursachten Endothelschäden gehören die Reduktion der Proteinsynthese und des ATP, die zur Abnahme der intrazellulären Energie führen (Tretyakov und Farber, 1995). Des Weiteren steigen die anaerobischen Metabolite an, die sowohl intra- als auch extrazellulär zu einer Azidose führen (Ogawa et al., 1990).

Signifikante Endothelzellschäden werden ebenfalls durch die Präparation der Vene, die Druckerhöhung während der Dichtigkeitsüberprüfung (Cook et al., 2004) und längere Ischämiezeiten durch Zwischenlagerung auf dem OP-Tisch herbeigeführt (Davies und Hagen, 1995). Zudem kommt es nach der Anastomosierung des venösen Grafts zu einer Überstreckung und zu tangentialem Stress (Shuhaiber et al., 2002).

Während der Reperfusion des venösen Grafts mit oxygeniertem Blut häufen sich vermehrt neutrophile Granulozyten an hypoxie-ischämie geschädigten Endothelzellen an (Verrier und Boyle, 1996). Diese aktivierten neutrophilen Granulozyten setzen freie Sauerstoffradikale und proteolytische Enzyme frei, wodurch sowohl gesunde Zellen, als auch die Extrazellulärmatrix

zerstört werden. Die Barrierefunktion des Endothels wird geschädigt und es kommt zu Zellödem und weiteren funktionellen Schäden des Endothels (Weiss, 1989).

Zudem steigt das plasmatische Fibrinogen durch den operativen Eingriff an und fördert eine prothrombotische Reaktion (Moor et al., 1994).

#### **1.4 Mögliche Vermeidungsstrategien der Endothelzellschäden in venösen Grafts**

Intraoperative Vermeidungsstrategien zur Reduktion der Endothelzellschäden beinhalten die sogenannte „no-touch“ Technik, welche einen minimalen instrumentalen und manuellen Kontakt empfiehlt (Gottlob, 1977). Die Dehnung der Vene sollte vermieden werden, indem die Dichtigkeitsüberprüfung mit einem Druck unter 100mmHg durchgeführt wird (Adcock et al., 1984). Die verwendete Lösung, in der die Vene zwischenlagert, ist ebenfalls von großer Wichtigkeit und geht mit funktionellen und morphologischen Änderungen des Endothels einher (Shuhaiber et al., 2002). Wie bereits erwähnt, weist die Vena saphena magna in bis zu 95% der Fälle von Patienten zwischen 60 und 70 Jahren eine Intimaverdickung auf, die zur Stenose prädisponiert (Stanley et al., 1973).

Zu den postoperativen Vermeidungsstrategien, die der Reduktion der Endothelzellschäden dienen, zählt unter anderem die tägliche Gabe von Aspirin. Damit sollte sechs Stunden nach der Bypassoperation begonnen werden, sofern das mit dem Risiko für postoperative Nachblutungen vereinbar ist (Motwani und Topol, 1998).

Ein arterielles Graft sollte nach Möglichkeit bevorzugt werden, da es weitaus bessere Langzeitergebnisse aufweist (Motwani und Topol, 1998).

#### **1.5 Okklusionsraten venöser und arterieller Grafts**

Die Okklusionsrate der Vena saphena magna Grafts ist sowohl in Kurz- als auch in Langzeitbeobachtungen höher als die Okklusionsrate arterieller Grafts. Dies liegt unter anderem an Struktur und Funktion der Venenwand, die durch den hohen Druck während der Präparation und der Anastomosierung im arteriellen System geschädigt wird. Wenn die Vene in den arteriellen Kreislauf eingebracht ist, ändert sich damit auch die Hämodynamik vom Niederdrucksystem zum Hochdrucksystem. Dieser hämodynamische Wandel ist mit verantwortlich für die funktionellen

und morphologischen Kurz- und Langzeitveränderungen in der Vene, die an der Entstehung der frühen Graftthrombose beteiligt sind (Tineli et al., 2007).

Die Offenheitsrate in venösen Grafts liegt nach einem Jahr bei 84% und sinkt nach zehn Jahren auf 61% ab (Goldman et al., 2004). In den nicht okkludierten Grafts weisen wiederum nur 50% der Grafts keine signifikante Stenose auf. Vom ersten bis sechsten postoperativen Jahr zeigt sich eine jährliche Steigerung der Verschlussrate von 1-2%. Ab dem siebten postoperativen Jahr steigt sie um weitere 4% (Bourassa, 1991; Campeau et al., 1984; Fitzgibbon et al., 1996).

Im Gegensatz dazu liegt die Offenheitsrate der IMA nach zehn Jahren noch bei 85% (Goldman et al., 2004).

Es werden auch andere arterielle Grafts verwendet, z.B. die Arteria radialis. Diese hat eine Offenheitsrate von etwa 85% nach 5 Jahren (Eagle et al., 1999).

Derzeit besteht die Behandlung der Bypassvaskulopathie in der Reoperation. Die Reoperationsrate liegt nach fünf Jahren bei 3%, nach zehn Jahren bei 10% und nach 15 Jahren bei 35% (Emmrich, 1998). Die PTCA und die Stent Implantation bieten weitere Behandlungsoptionen bei lokalisierten Folgen der Vaskulopathie. Häufig ist diese allerdings global und langstreckig, sodass eine Reoperation durchgeführt wird.

Die pathologischen Veränderungen der venösen Grafts setzen sich aus drei einzelnen Prozessen zusammen:

- 1) Thrombose
- 2) Intimahyperplasie
- 3) Arteriosklerose

### **1.5.1 Die Thrombose**

Die Thrombose tritt gewöhnlich innerhalb des ersten postoperativen Monats auf (Motwani und Topol, 1998). Der während der Operation entstehende Endothelschaden führt zur Akkumulation von Fibrin auf der Endotheloberfläche, zur Adhäsion von Thrombozyten und neutrophilen Granulozyten (Dilley et al., 1992; Verrier und Boyle, 1996) sowie zur reduzierten Produktion des tPAs (Nachman und Silverstein, 1993).

Kommt es zur Freilegung des subendothelialen Gewebes auf Grund des Verlustes an Endothel, wird die extrinsische Gerinnung aktiviert (Verrier und Boyle, 1996).

Weiterhin wird die Aktivität von Thrombomodulin, einem antithrombotischen Regulationsprotein, nach der Bypassoperation abgeschwächt, was zu einer prothrombotischen Reaktion führt (Cook et al., 1991). Daneben spielen die Regulatoren Heparin-Sulfat, NO und Prostazyklin in der Pathogenese eine entscheidende Rolle. Die Konzentrationen sind in Venen niedriger als in Arterien, was einen prothrombotischen Effekt auslöst (Cox et al., 1991).

Weiterhin reagiert das denaturierte Endothel der Vena saphena magna sehr sensibel auf zirkulierende Vasokonstriktoren, vor allem auf Endothelin-1 (Verrier und Boyle, 1996).

3% bis 12% der venösen Grafts weisen thrombotische Verschlüsse im ersten Monat nach der Bypassoperation auf (Bourassa, 1991; Fitzgibbon et al., 1996).

### **1.5.2 Die Intimahyperplasie**

Die Intimahyperplasie ist vom ersten bis zum zwölften postoperativen Monat die bedeutendste pathologische Veränderung, die zur Okklusion führen kann. Unter der Intimahyperplasie versteht man die Akkumulation und Proliferation glatter Muskelzellen und extrazellulärer Matrix in der Intima. Nahezu alle Bypassvenen entwickeln innerhalb von vier bis sechs Wochen eine Intimahyperplasie, die das Lumen bis zu 25% reduzieren kann. Dieser Prozess allein führt nur selten zu signifikanten Stenosen. Dennoch induziert die Intimahyperplasie letztendlich die Bildung arteriosklerotischer Plaques (Motwani und Topol, 1998).

Thrombozyten, aktivierte Endothelzellen und Makrophagen produzieren Wachstumsfaktoren und Zytokine, die die glatten Muskelzellen in der Media stimulieren. Daraufhin folgt die Migration der glatten Muskelzellen in die Intima mit einer weiteren Proliferation (Cox et al., 1991; Dilley et al., 1992). Die Ischämiezeit, der die Vene während der Bypassoperation ausgesetzt ist, führt zu einer erhöhten Bildung von freien Radikalen, die die Proliferation von glatten Muskelzellen direkt induzieren (Rao und Berk, 1992). Während der Operation werden die Vasa vasorum verletzt, was ebenfalls zu einer Ischämie führt. Die Proliferation glatter Muskelzellen wird dadurch getriggert (Rao und Berk, 1992).

Durch die arteriellen Druckbedingungen kommt es zur Druckbelastung der Gefäßwand, welches zur vermehrten Expression von bFGF-Rezeptoren auf den glatten Muskelzellen der Intima führt. Dies bewirkt ebenfalls eine Proliferation (Nguyen et al., 1994).

Auf Grund der geringeren Scherkraft bei reduzierter Flussrate werden PDGF, bFGF und Endothelin-1 vermehrt produziert und reduzieren so die Produktion von Wachstumsinhibitoren wie NO und tGF. Es kommt zu einem Ungleichgewicht zwischen wachstumsinduzierenden und –inhibierenden Faktoren zugunsten einer vermehrten Proliferation und Intimahyperplasie (Allaire und Clowes, 1997; Cox et al. , 1991).

### **1.5.3 Die Arteriosklerose**

Nach dem ersten postoperativen Jahr ist die Arteriosklerose die Hauptursache für die Graftschäden. Arteriosklerotische Plaques lassen sich bereits in den ersten drei bis sechs Monaten nach der Revaskularisierung finden (Luscher, 1991). Stenosen, die hämodynamisch relevant sind, treten allerdings nur selten vor dem dritten postoperativem Jahr auf (Motwani und Topol, 1998). Nach dem sechsten postoperativem Jahr lassen sich in 17% der Grafts arteriosklerotische Veränderungen finden und nach elf Jahren steigt die Rate auf 46% an (Bourassa et al., 1985).

Histologisch lassen sich im Unterschied zur Arteriosklerose der nativen Koronararterien in den venösen Grafts Entzündungszellen erkennen. Diese Entzündungszellen setzen sich aus Lymphozyten, Plasmazellen und Makrophagen zusammen, die teilweise die Media und die Adventitia infiltrieren (Ratliff und Myles, 1989). Morphologisch zeigen sich eine diffuse, konzentrische Anordnung der Läsionen, kleine Verkalkungsherde und eine schwach ausgebildete oder fehlende fibröse Kappe. In der Arteriosklerose der nativen Koronararterien sind die Läsionen exzentrisch, es gibt eine fibröse Kappe und weniger Entzündungszellen (Kalan und Roberts, 1990).

Der Lipidstoffwechsel in der Vena saphena magna fördert die Bildung von arteriosklerotischen Plaques. Die Lipolyse verläuft langsamer und es werden mehr Lipide synthetisiert sowie aufgenommen als in nativen Koronararterien (Shafi et al., 1987). Außerdem führen erhöhte Raten an Apolipoprotein B und geringe Raten an HDL zur Ausbildung arteriosklerotischer Plaques (Campeau et al. , 1984).

Des Weiteren spielt die Apoptose der glatten Muskelzellen eine zentrale Rolle in der Pathogenese der Arteriosklerose. Dabei wird das Schicksal des arteriosklerotisch veränderten Venengrafts

durch die Balance zwischen Proliferation und Apoptose der glatten Muskelzellen in den Graftläsionen bestimmt (Best et al., 1999).

Faktoren, die die Apoptose in vaskulären glatten Muskelzellen induzieren können, sind TNF und Interleukin-1, die von den Makrophagen produziert werden. IFN wird von den T-Lymphozyten produziert und kann ebenfalls die Apoptose in glatten Muskelzellen induzieren (Geng et al., 1996).

Auch NO induziert Apoptose, vermutlich durch die Aktivierung von Fas auf der Oberfläche der glatten Muskelzellen (Fukuo et al., 1996; Pollman et al., 1996).

Im Gegensatz dazu inhibieren Angiotensin II, IGF-1, bFGF und PDGF die Apoptose glatter Muskelzellen und induzieren dadurch ihre Proliferation (Fox und Shanley, 1996; Pollman et al., 1996).

Die Induktion der Apoptose in glatten Muskelzellen führt zur Ruptur arteriosklerotischer Plaques mit anschließendem thrombotischem Graftverschluss. Es kommt außerdem zur Vergrößerung der Plaques und zur Entstehung von Aneurysmata (Clarke et al., 2008).

Die Apoptoserate steigt mit Zunahme der arteriosklerotischen Plaques. In rupturierten Plaqueläsionen werden außerdem mehr apoptotisch glatte Muskelzellen gefunden als in nicht rupturierten Plaques (Clarke et al., 2006).

## **1.6 Die Apoptose**

Der Begriff „Apoptose“ beschreibt einen in eukaryontischen Zellen vorkommenden programmierten Zelltod, durch den einzelne Zellen ohne Belastung des Gesamtorganismus in Metazoen eliminiert werden. Die Apoptose spielt sowohl in der embryonalen Entwicklung als auch im adulten Organismus als Gegenspieler der Proliferation eine wichtige Rolle für die Aufrechterhaltung der Gewebemöostase (Lauber, 2004). Die Apoptose wurde erstmals 1965 von Kerr beschrieben (Kerr, 1965). Der apoptotisch regulierte Zelltod muss vom nekrotischen Zelltod unterschieden werden. Morphologische und biochemische Kriterien der Apoptose sind die Bildung von Ausstülpungen an der Zellmembran (membrane blebbing), die Kondensation des Chromatins und des Zytoplasmas, sowie ein Volumenverlust der Zelle. Die Zelle löst sich von den benachbarten Zellen ab. Das Membranpotential der Mitochondrien bricht zusammen, wobei die genomische DNA zwischen den Nukleosomen gespalten wird und DNA-Bruchstücke



entstehen. Der Zellkern wird fragmentiert und die Zelle zerfällt in kleine, membranumschlossene Partikel. Im Gegensatz zur Nekrose bleibt der Zellinhalt permanent von einer Membran umschlossen und wird nicht in das umliegende Gewebe freigesetzt. Die Bildung der membranumschlossenen Partikel bezeichnet man als apoptotic bodies. Diese werden von Phagozyten oder benachbarten Zellen erkannt und ohne begleitende Umgebungsreaktion abgebaut (Lauber, 2004).

Die Apoptose kann durch eine Reihe von Stimuli induziert werden. Dazu zählen unter anderem Hitze, Toxine, freie Radikale und Glukokortikoide (Thompson, 1995). Es sind heute mindestens zwei Signalwege bekannt, die die Apoptose auslösen können: der extrinsische Signalweg und der intrinsische, mitochondriale Signalweg. Beide Wege enden mit der Aktivierung der Caspase-Kaskade.

Der *extrinsische Signalweg* wird durch eine Subfamilie der TNF-Rezeptor-Superfamilie ausgelöst, die sog. Todesrezeptoren. Hierzu gehören unter anderem die Todesrezeptoren CD<sub>95</sub> und der TNF-Rezeptor<sub>1</sub>. Sie haben mehrere extrazelluläre cysteinreiche Domänen, eine Transmembranregion und eine intrazelluläre Todesdomäne (DD, death domain). Die Todesdomäne ist für die Transduktion des zytotoxischen Signals essenziell. Am besten ist die Signaltransduktion der durch Todesrezeptoren vermittelten Apoptose bislang am CD<sub>95</sub>-Rezeptor/Liganden-System untersucht worden. Der CD<sub>95</sub>-Rezeptor wird durch den CD<sub>95</sub>-Liganden stimuliert und leitet damit die Bildung des Todessignalkomplexes ein (DISC, death inducing signaling complex). Hierbei bindet das Adapterprotein FADD (fas-associating protein with death domain) intrazellulär an den CD<sub>95</sub>-Rezeptor. FADD verfügt über die sog. Todeseffektordomäne (DED, death effector domain), eine weitere Interaktionsdomäne. Diese rekrutiert die Procaspase-8 über die Bindung an deren Todeseffektordomäne an den DISC. Auf diese Weise werden mehrere Procaspase-8-Moleküle am DISC zueinander gebracht. Die Procaspase wird autoproteolytisch prozessiert. Die Caspase-8 ist in der Lage, die Caspase-Kaskade auszulösen und damit die Apoptose einzuleiten (Lauber, 2004).

Beim *intrinsischen, mitochondrialen Signalweg* wird Cytochrom-c aus dem Mitochondrium freigesetzt. Das Cytochrom-c induziert im Zytosol die an die Hydrolyse von ATP oder dATP gekoppelte Oligomerisierung des Adapterproteins Apaf-1 (apoptotic protease activating factor1). Dieser Apaf-1-Komplex bildet einen Aggregationskeim, der mit dem CD<sub>95</sub>-FADD-Komplex vergleichbar ist. Über eine Wechselwirkung seiner CARD-Adapter-Domäne (CARD, caspase recruitment domain) mit der CARD-Region von Procaspase-9 wird diese an den Apaf-1-

Komplex rekrutiert und es entsteht das sog. Apoptosom. Procaspase-9 wird autoproteolytisch prozessiert und somit aktiviert. Caspase 9 ist in der Lage, die Caspase-Kaskade auszulösen und leitet so die Apoptose ein (Lauber, 2004).

Ebenfalls an der zentralen Regulation der Apoptose beteiligt sind die Mitglieder der Bcl-2-Familie. Sie kontrollieren die Cytochrom-c-Freisetzung aus den Mitochondrien (Lauber, 2004).

Des Weiteren reguliert das Tumorsuppressorgen p53 die Apoptose. Es überprüft die DNA auf Schäden und löst gegebenenfalls die Apoptose bei irreversiblen Schaden aus (Lane, 1993).

Abbildung 1 stellt die Signalwege der Apoptose dar.

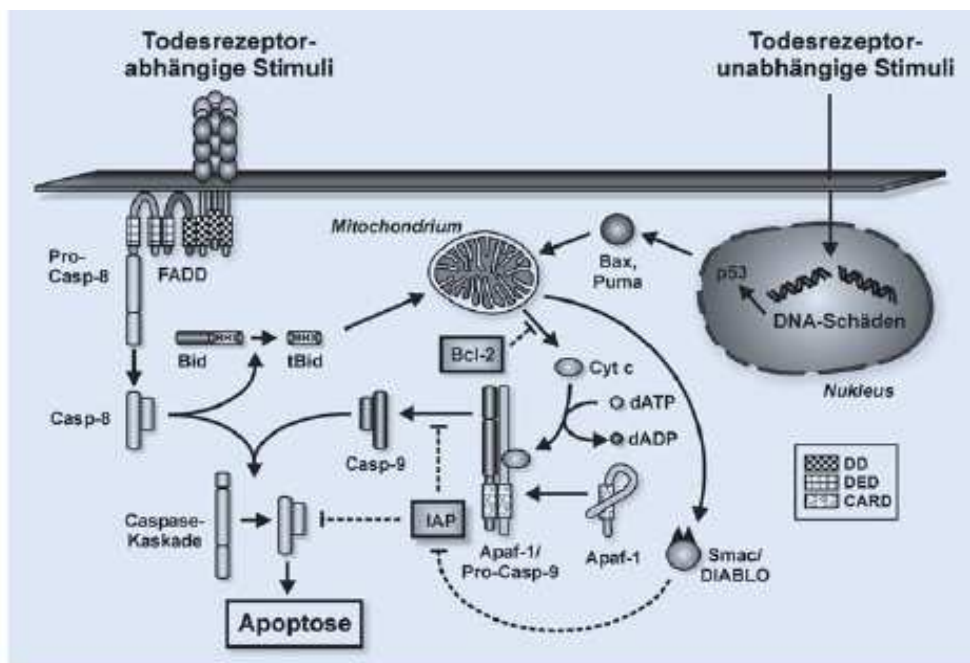


Abbildung 1: Signalwege der Apoptose (Lauber, 2004)

Tabelle 2 zeigt die Regulatoren der Apoptose.

Induktoren der Apoptose	Inhibitoren der Apoptose
Fas	bcl-2
Caspasen	Angiotensin II
p53	Endothelin-1
Bax	
NO	
ANP	
erhöhtes intrazelluläres Ca	

*Tabelle 2: Regulatoren der Apoptose im Überblick (Best et al. , 1999)*

## 1.7 Die Lösungen Via Span und Z44

Der Einsatz einer geeigneten Konservierungslösung stellt neben der sogenannten „no-touch“ Technik und der Leckagenkontrolle mit einem Druck unter 100mmHg einen wichtigen Aspekt in der Vermeidung von Endothelschäden dar (Shuhaiber et al. , 2002).

Konservierungslösungen können in extra- und intrazelluläre Lösungen in Abhängigkeit von ihrer Ionenzusammensetzung eingeteilt werden. Extrazelluläre Lösungen enthalten mindestens 70mmol/l Natrium während intrazelluläre Lösungen weniger als 70mmol/l Natrium enthalten (Parolari et al., 2002). Sowohl die Via Span- als auch die Z44-Lösung gehören zu den intrazellulären Lösungen.

### 1.7.1 Die Lösung Via Span

Die Via Span-Lösung, auch University of Wisconsin Lösung genannt, wurde in den 80er Jahren als eine intrazelluläre Lösung für die Pankreas Transplantation entwickelt (Wahlberg et al., 1986). Die Effektivität dieser Lösung ist für Konservierung von Herz und Lunge bewiesen (Rinaldi et al., 1995; Swanson et al., 1988).

Der potente Schutz der Zellen vor einem entstehenden Zellödem und die antioxidative Wirkung sind die Charakteristika der Via Span-Lösung (Garlicki, 2003; Kajihara et al., 2006).

Die Via Span-Lösung wirkt der Bildung einer intrazellulären Azidose, die sich während der ablaufenden anaeroben Glykolyse aufgrund der Ischämiezeit entwickelt, entgegen (Cavallari et al., 1997).

In vorausgehenden Studien zeigte sich eine gute Protektion der endothelialen Funktion im Vergleich zur St. Thomas und Euro-Collins-Lösung (Alamanni et al., 2002).

Die Via Span Lösung setzt sich aus folgenden Bestandteilen zusammen:

Potassium Lactobionate	100mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	25mM
MgSO <sub>4</sub>	5mM
Raffinose	30mM
Adenosine	5mM
Glutathione	3mM
Allopurinol	1mM
Hydroxyethyl starch	50g/l

*Tabelle 3: Zusammensetzung der Via Span-Lösung*

### **1.7.2 Die Lösung Z44**

Die Lösung Z44 ist eine intrazelluläre Lösung, die von der Firma Köhler, Bensheim entwickelt wurde. Sie ist bis jetzt nicht auf dem Markt erhältlich. Die Osmolarität dieser Lösung beträgt 310 mosmol/kg.

Die Z44-Lösung setzt sich aus folgenden Bestandteilen zusammen:

	[mmol/l]
Na <sup>+</sup>	16
K <sup>+</sup>	93
Mg <sup>2+</sup>	8
Ca <sup>2+</sup>	0,05
Cl <sup>-</sup>	103,1
PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	1
Aspartat	5
N-Ac-Histidin	30
Glycin	10
L-Alanin	5
Tryptophan	2
Ketoglutarat	2
Saccharose	20
Desferal	0,2
LK 614	0,02

*Tabelle 4: Zusammensetzung der Z44-Lösung*

## 1.8 Ziel der Arbeit

Wie in der Einleitung aufgezeigt werden konnte, spielt die Lösung und die Dauer, in der das venöse Graft zwischengelagert wird, eine wichtige Rolle in der Pathogenese der Bypassvaskulopathie.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist daher die Ermittlung, die Lokalisation und die Bestimmung der Apoptoserate in den venösen Grafts nach Aufbewahrung in den zwei verschiedenen Konservierungslösungen, Via Span und Z44, unter definierten Bedingungen.

## **2. Material und Methoden**

### **2.1 Materialgewinnung**

#### **2.1.1 Patientenkollektiv**

30 Patienten (Durchschnittsalter 65,5 Jahre; 3 weiblich, 27 männlich) unterzogen sich einer Bypass-Operation. Vor dem Eingriff hatten die Patienten ihr Einverständnis für die nachfolgende Untersuchung an einem Teilstück der verwendeten Vena saphena magna gegeben. Die Zustimmung der Ethikkommission lag vor.

#### **2.1.2 Versuchsaufbau**

Vor der Versuchsdurchführung wurde der Arbeitsplatz im Operationsbereich vorbereitet. Hierfür wurden 1000µl Formalin (Roti-Histofix 4%, VWR International GmbH, Langenfeld) in kleine Eppendorf Caps pipettiert. Die bereits gekühlten Präservationslösungen Z44 und Via Span wurden in Eppendorf-Röhrchen pipettiert. Alle Lösungen lagerten bis zur Venenentnahme im 4°C regulierten Kühltank im OP-Bereich.

#### **2.1.3 Versuchsdurchführung**

Bei der Freilegung der Vena saphena magna bestimmte der Operateur die Länge des Präparates, welches für die anschließende Bypassoperation benötigt wurde. Die Endstücke der Vene, die zur Operation nicht verwendet wurden, bildeten das Versuchsmaterial. Die Versuchsprobe wurde entnommen und ohne vorher zwischengelagert zu werden unverzüglich mit einem Einmalskalpell (Fig.10, Feather Safety Razor Co., Köln) in sieben gleich große Stücke geteilt. Das Procedere begann in weniger als einer Minute nach der Entnahme. Das Venenstück stammte in 26 Fällen direkt aus der Vena saphena magna und in vier Fällen aus einem kaliberstarken Seitenast der Vena saphena magna. Beim Schneiden mit dem Skalpell war darauf zu achten, dass beim

Fixieren der Vene mit der Pinzette kein hoher Kompressionsdruck auf die Venenwand ausgeübt wurde, um ein mechanisches Trauma zu verhindern. Zur Bestimmung des Apoptoseindex in den einzelnen Venenschichten nach unterschiedlichen Zeitpunkten der Einlagerung wurden drei Venenstücke in die Z44-Lösung und drei Stücke in die Via Span-Lösung eingelegt. Die Venenstücke mussten während der Einlagerung in Medium vollständig benetzt werden. Die Lösungen hatten jeweils eine Temperatur von 4°C. Für den Zeitpunkt 0 Minuten wurde ein Venenstück in Formalin fixiert und bei 4°C gelagert. Nach den Zeitpunkten 30, 60 und 90 Minuten wurden die Venenstücke aus den Lösungen entnommen, ebenfalls in Formalin konserviert und bei 4°C für 24 Stunden gelagert. Danach wurden die Venenstücke in Einbettkassetten (Histosette® RII, VWR International GmbH, Langenfeld) für zwei Stunden mit kaltem, fließendem Wasser gewässert, um das Formalin auszuwaschen. Nun wurden die Einbettkassetten in 70% Isopropanol gelagert oder direkt im Einbettautomat (Microm STP120, ThermoFisher Scientific GmbH, Dreieich) entwässert und in flüssiges Paraffin (Mischung 50:50 Paraffin Typ 9 und Paraffin Typ 6, ThermoFisher Scientific GmbH, Dreieich) gebettet.

Von diesen paraffineingebetteten Venenproben wurden Gewebeschnitte mit dem Schlittenmikrotom (Leica SM 2000R, Leica Microsystems GmbH, Bensheim) angefertigt. Es wurden von jeder Probe drei Schnitte mit einer Schnittdicke von 5µm zum Zeitpunkt 0, 30, 60 und 90 Minuten angefertigt und auf einen mit den Initialen des Patienten beschrifteten und beschichteten Objektträger (Marienfeld-Histo Bond, Marienfeld GmbH+Co.KG, Lauda-Königshofen) aufgezogen. Anschließend wurden sie für ca. 24 Stunden bei 42°C im Inkubator (Heraeus B6030, VWR International GmbH, Langenfeld) getrocknet.

## 2.2 Histochemie und Immunhistochemie

### 2.2.1 TUNEL-Test

Mit der Entdeckung, dass der programmierte Zelltod mit einer Fragmentierung der DNA verknüpft ist, ergab sich die Möglichkeit, diesen Vorgang darzustellen und ihn quantitativ zu bewerten. Es stehen heute zwei Möglichkeiten zur Verfügung, um apoptotische Zellen in histologischen Schnitten zu markieren: die ISNT-Methode (In-situ-nick-Translation) und die TUNEL-Methode (terminal desoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling), die 1992 von Gavrieli et al. vorgestellt wurde (Gavrieli et al., 1992). Das Prinzip der TUNEL-Methode beruht auf der *in-vitro*-Markierung der DNA-Fragmentation in multiple Fragmente von ca. 180-200bp Länge (Majno und Joris, 1995), die beim Abbau der DNA während der Apoptose durch die Enzymaktivität von Endonukleasen entstehen (Compton, 1992). Die freien 3'-OH-Enden der DNA werden für die lichtmikroskopische Auswertung mit an Biotin gekoppelten Nukleotiden markiert. Im Vergleich zur ISNT-Methode mit Gebrauch von DNA-Polymerasen stellt die TUNEL-Methode eine sensitivere und spezifischere Methode dar (Gavrieli et al., 1992).

Prinzipiell stellt der TUNEL-Test eine gute Methode zum Nachweis der Apoptose dar.

Allerdings wurde beobachtet, dass auch eine Minderheit an nekrotischen Zellen TUNEL-positiv markiert wird. Anhand der morphologischen Merkmale können nekrotische von apoptotischen Zellen aber gut unterschieden und aussortiert werden. Während der Nekrose tritt der DNA-Strangbruch erst im späten Stadium auf, wenn morphologische Veränderungen bereits eindeutig sind (Labat-Moleur et al., 1998).

Die Spezifität des TUNEL-Testes wird durch Ereignisse begrenzt, die mit unvermeidlichen DNA-Strangbrüchen einhergehen. Dazu zählen unter anderem DNA-Rekombination, DNA-Replikation und DNA-Reparatur. Das kann zu falsch positiven Ergebnissen führen (Boyle, 1999). Es werden neben den typischen Apoptoseabläufen auch atypische Verläufe beschrieben, die nicht mit einer DNA-Fragmentierung einher gehen (Zamai et al., 1996).

Dennoch stellt der TUNEL-Test eine Methode mit hoher Spezifität zum Nachweis apoptotischer Zellen dar, da diese Zellen einen höheren Gehalt an DNA-Fragmenten aufweisen (Ansari et al., 1993).



### 2.2.2 Durchführung des TUNEL-Testes

Die Identifizierung von Zelltod erfolgte durch antikörpervermittelte enzymatische Markierung von DNA-Einzelstrangbrüchen mit Hilfe des TUNEL-Testes.

Zunächst wurden die Gewebeproben entparaffiniert. Dafür brachte man die Objektträger mit den Gewebeproben dreimal in Xylol für jeweils sieben Minuten ein. Danach folgte eine absteigende Alkoholreihe. Die Objektträger kamen zweimal für fünf Minuten in 98%igen Alkohol und anschließend ebenfalls für fünf Minuten in 90%igen und 70%igen Alkohol. Anschließend wurden die Gewebeproben mit destilliertem Wasser für fünf Minuten gewässert. Die nun entparaffinierten Schnitte konnten dem TUNEL-Test zugeführt werden.

Jeder Gewebeschnitt wurde auf dem Objektträger mit einem Diamantstift umkreist und eine Negativkontrolle markiert. Nun folgte die Proteolyse des Gewebes mit Hilfe der Proteinkinase K (Roche, Mannheim) in einer Verdünnung von 1:1000, die mit einer Eppendorf-Pipette auf das Gewebe aufgebracht und für 30 Minuten bei 37°C in einer feuchten Kammer inkubiert wurde. Anschließend wurde zweimal für fünf Minuten mit PBS-Puffer (pH 7,2-7,4) gespült. Um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren, wurden die Proben mit fetalem Kälber Serum (FCS) im Verhältnis FCS: PBS = 1:25 für 30 Minuten bei Raumtemperatur in der feuchten Kammer gelagert. Im Anschluss wurde das FCS abgeklopft. Von den aufgetauten TUNEL-Reagenzien (In Situ Cell Death Detection Kit, AP, Roche, Mannheim) wurden 50µl der Marker-Lösung (= Nucleotid-Mix in Puffer) auf die zuvor bestimmte Negativkontrolle pipettiert. Der Rest wurde mit der Enzymlösung (Terminale desoxynucleotidyl Transferase aus Kälberthymus in Puffer) gemischt, kurz zentrifugiert und sofort aufgetragen. Auf die Negativkontrolle kam nur der Marker und kein Enzym. Nach 10minütiger Inkubation bei 37°C in der feuchten Kammer wurde erneut zweimal für jeweils fünf Minuten mit PBS gespült. Der nächste Schritt beinhaltete die Inkubation mit dem Converter-AP/ Magermilchpulver-Gemisch in einem Verhältnis von 1:1 bei 37° C in der feuchten Kammer für 30 Minuten. Nun wurde erneut für zweimal fünf Minuten mit PBS gespült. Die im Dunkeln zerkleinerte Fast Red Tablette wurde mit 5ml Fast Red Substrat Puffer gelöst und sofort aufgetragen. Bei Raumtemperatur ließ man die Lösung für 30 Minuten im Dunkeln einwirken. Die Proben wurden anschließend für sechs Minuten mit destilliertem Wasser gewässert. Die Kern-Gegenfärbung mit Mayer's Hämalum (VWR International GmbH, Langenfeld) für eine Minute folgte nun. Hierbei entwickelte sich der Farbstoff durch das sich anschließende Spülen

mit lauwarmem, fließendem Leitungswasser für fünf Minuten. Zum Schluss wurden die Proben auf den Objektträgern mit einem wasserlöslichen Eindeckmittel (Aquatex<sup>®</sup>, VWR International GmbH, Langenfeld) eingedeckelt.

Nun konnten die Proben unter dem Lichtmikroskop (Olympus Optical Co. GmbH, Hamburg) bei 40facher Vergrößerung ausgewertet werden. Hierbei mussten positiv ausgefallene Gewebeschnitte ein rotes Signal um den pygnotischen Kern zeigen, und die Negativ-Kontrolle durfte nur lila gefärbte Zellkerne beinhalten. Unter den Negativkontrollen gab es keine falsch positiven Ergebnisse.

### **2.2.3 Hämatoxylin-Eosin-Färbung**

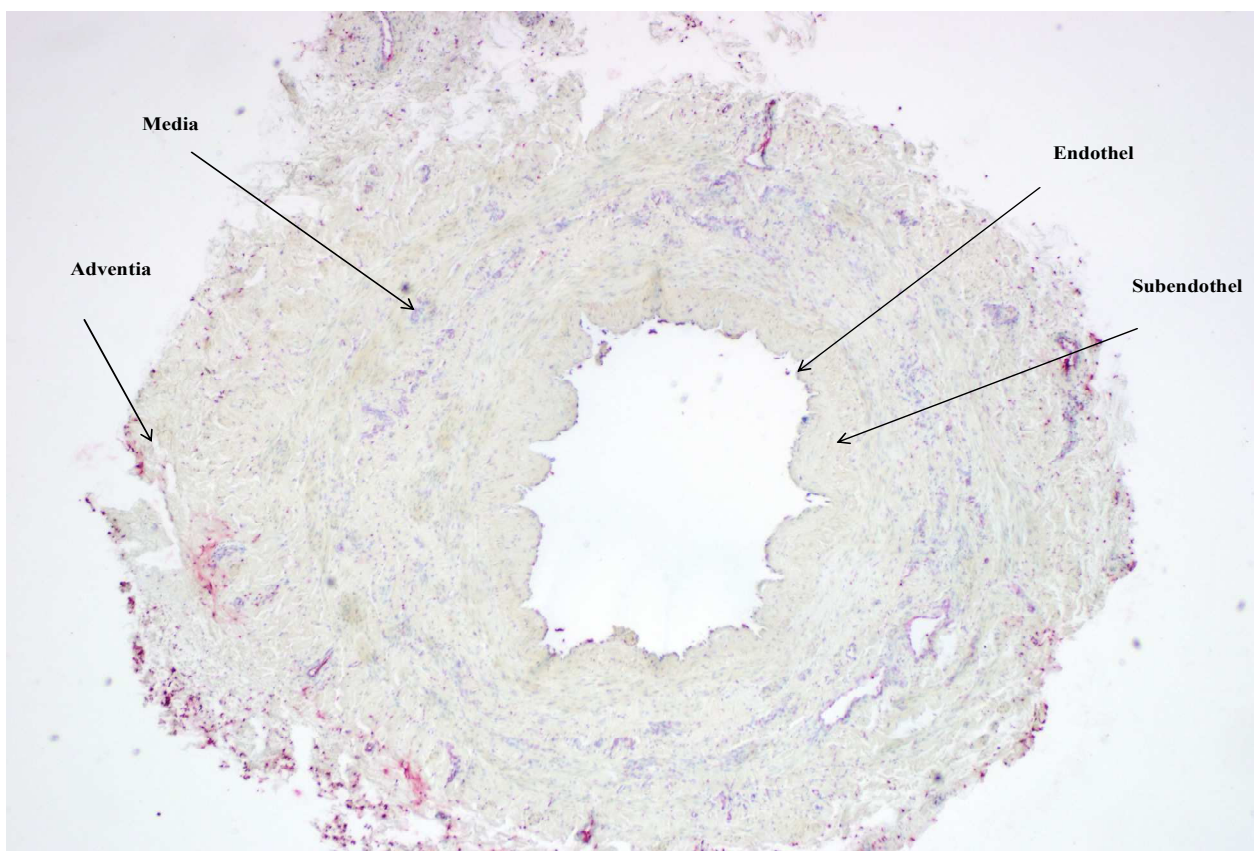
Die 5µm dicken Schnitte der Gewebeproben wurden wie beim TUNEL-Test in Xylol und einer absteigenden Alkoholreihe mit den gleichen Prozentzahlen entparaffiniert. Anschließend wurden die Proben mit Aqua dest. gespült. Nun erfolgte die Kernfärbung. Die Proben wurden für fünf Minuten in der bereits angesetzten Hämatoxylin-Lösung (VWR International GmbH, Langenfeld) gefärbt und anschließend für fünf Minuten unter fließend warmem Wasser gespült. Danach folgte die Plasmafärbung mittels Eosin-Lösung (Roth, Karlsruhe), wobei die Objektträger für ein bis zwei Minuten in die Lösung eingetaucht wurden. Nun wurden die Proben erneut kurz mit destilliertem Wasser gespült und danach zur Differenzierung drei- bis sechsmal in 70%igen Alkohol eingetaucht. Es erfolgte das erneute drei- bis sechsmalige Eintauchen in nun 90%igen Alkohol. Anschließend wurde zum Entwässern eine absteigende Alkoholreihe für jeweils zweimal fünf Minuten durchgeführt. Nach dreimal sieben minütigem Verbleib in Xylol konnten die Objektträger mit Entellan (VWR International GmbH, Langenfeld) eingedeckelt und unter dem Lichtmikroskop beurteilt werden.

## 2.3 Bestimmung der Morphologie

### 2.3.1 Quantitative Bestimmung der Zelldichte

Die morphologische Analyse der TUNEL-gefärbten Präparate erfolgte mit Hilfe der Software *analySIS® Image Processing*.

Insgesamt wurden von den 30 Patientenproben pro Schicht, Endothel, Subendothel, Media und Adventitia, und pro Zeitpunkt, 0, 30, 60 und 90 Minuten, vier zufällig ausgewählte Areale mit der Digitalkamera Olympus DP 70 fotografiert und an den Computer übermittelt. Nun wurde die jeweilige Zellzahl bestimmt. Hierbei wurden die apoptotischen Zellen nicht mitgezählt.

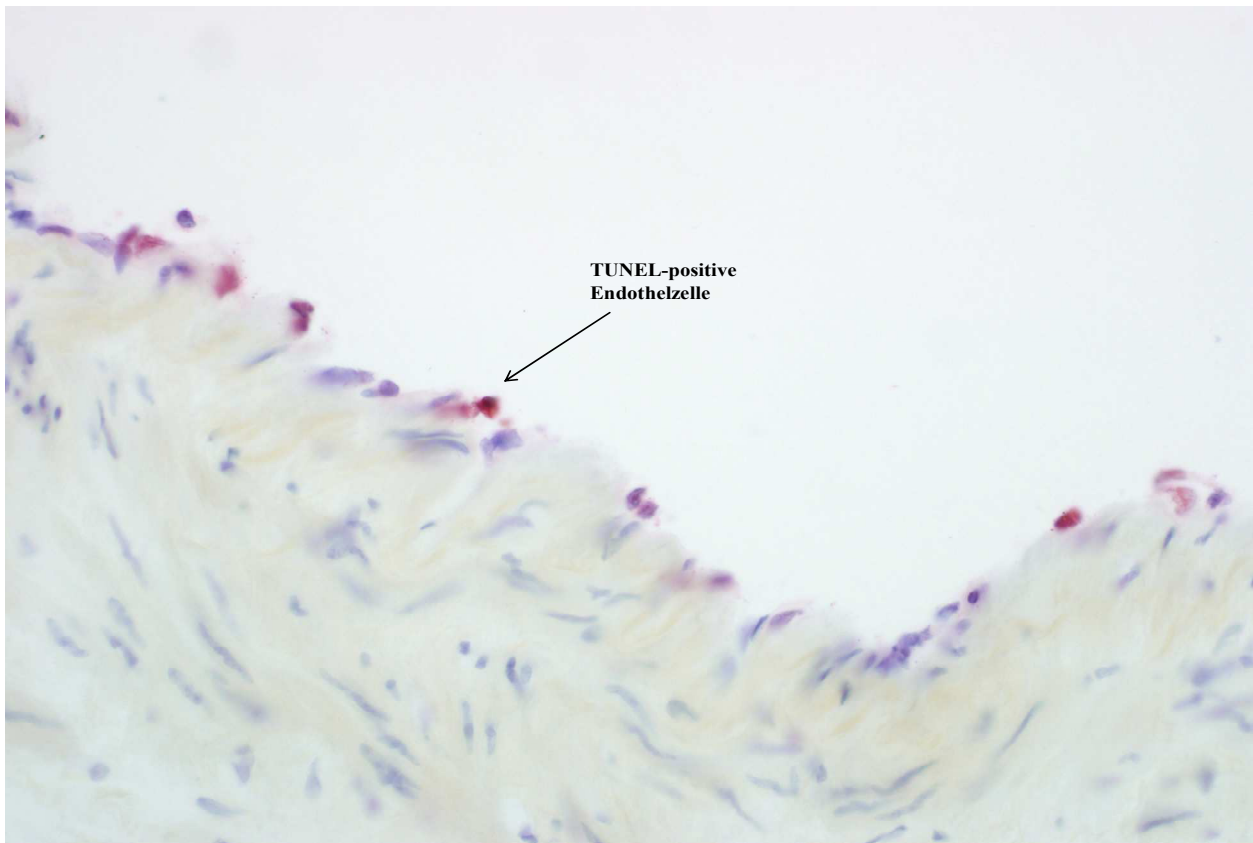


*Abbildung 2: Histologischer Querschnitt einer Vene mit erhaltenem Lumen. TUNEL-Färbung, Vergrößerung x 4. Zu sehen sind die Wandschichten Intima, die sich in das Endothel und das Subendothel unterteilt, sowie die Media und die Adventitia*

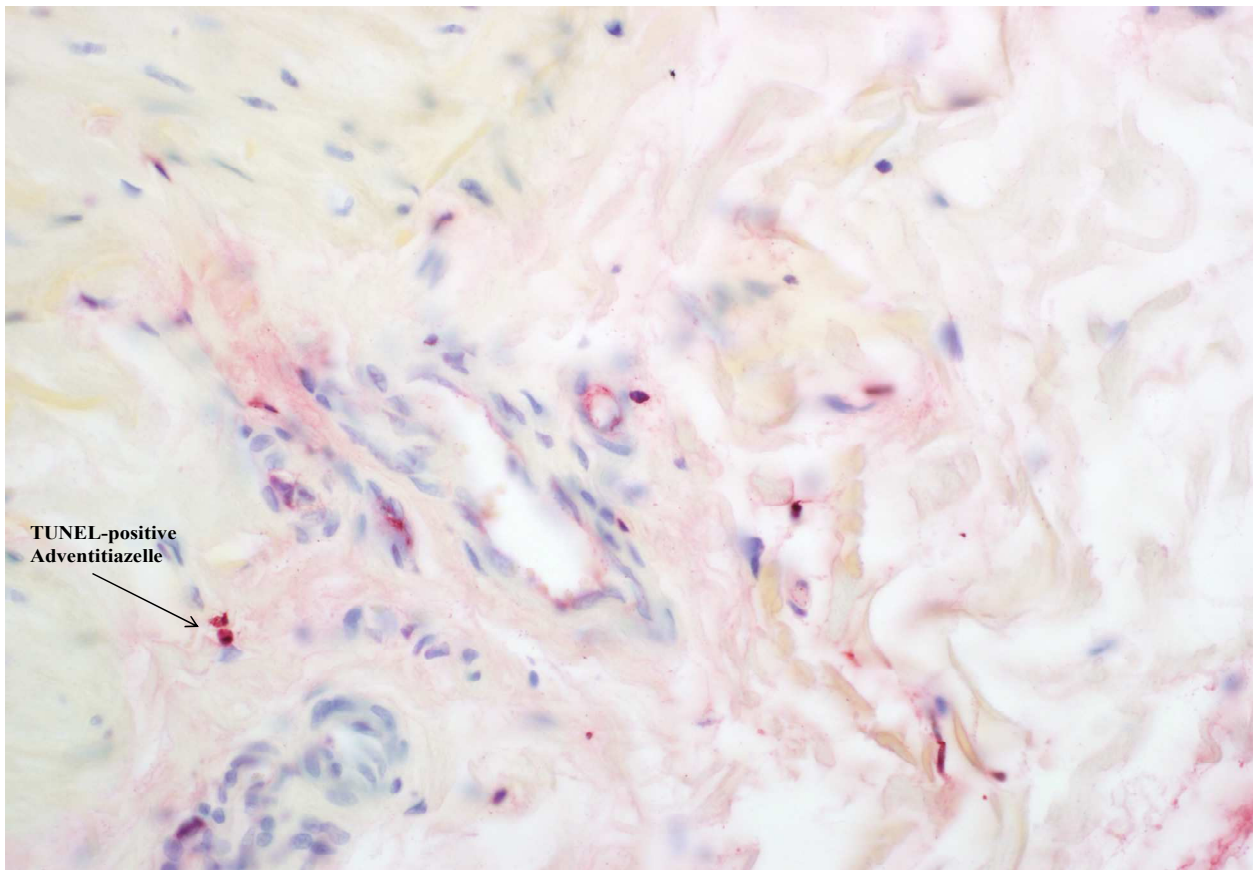
### 2.3.2 Quantitative Bestimmung der Expression immunhistochemischer Signale

Um die immunhistochemischen Signale zu bestimmen, wurde die Anzahl (rot) markierter Zellen gezählt, die mit dem jeweiligen Primärantikörper spezifisch reagiert hatten. Nun wurde die Morphologie der Zellen beurteilt. Dabei wurde zwischen Zellen unterschieden, die morphologische Kriterien der Nekrose und Kriterien einer Apoptose aufwiesen. Morphologische Kriterien der apoptotischen Zellen waren Zellschrumpfung, „apoptotic bodies“ und Auffaltung der Zellmembran („membran blebbing“).

Nun wurde der Quotient aus den apoptotischen Zellen und der Gesamtzellzahl berechnet.



*Abbildung 3: Gesichtfeldausschnitt Venengraft. TUNEL-Färbung, Vergrößerung x 40. Zu sehen sind TUNEL-positive Zellkerne im Endothel, die von blauen, TUNEL-negativen Zellkernen, umgeben sind*



*Abbildung 4: Gesichtfeldausschnitt Venengraft. TUNEL-Färbung, Vergrößerung x 40. Zu sehen sind TUNEL-positive Zellkerne in der Adventitia, die von blauen, TUNEL-negativen Zellkernen, umgeben sind*

## 2.4 Statistische Analyse

Die Berechnung der Signifikanz erfolgte mit dem Kruskal-Wallis-Test und dem Mann-Whitney-Test. Bei einem p-Wert von  $<0,05$  wurden bei den genannten Tests die verglichenen Gruppen als signifikant verschieden bewertet. Die Daten wurden als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung angegeben.

## 2.5 Geräte und sonstige Materialien

### 2.5.1 Chemikalien und Zusatzlösungen für den TUNEL-Test

Zur Detektion der apoptotischen Zellkerne wurde das TUNEL-Kit der Firma Roche Diagnostics, Mannheim, bezogen. Von den Firmen VWR International GmbH, Langenfeld, Biozol Diagnostica GmbH, Eching, Biochrom, Berlin, und Roche Diagnostics, Mannheim, wurden weitere Chemikalien und Zusatzlösungen verwendet.

Lösungen	Zusammensetzung
Proteinkinase K (Roche, Mannheim)	10µl Proteinkinase K + 990µl Tris, davon 100µl + 900µl Tris
Fetales Kälber Serum (Biochrom, Berlin)	100µl FCS + 2400µl PBS
Fast Red Tabletten (Biozol, Eching)	1 Tablette in 5ml Puffer lösen
Fast Red Substrat Puffer (Biozol, Eching)	fertig angesetzt
Converter-AP/ Magermilchpulver-Puffer (VWR, Langenfeld)	500µl Converter-AP + 500µl Magermilchpuffer
Hämalaun (VWR, Langenfeld)	Hämalaun nach Mayer fertig angesetzt

*Tabelle 5: Zusammensetzung der Lösungen für den TUNEL-Test*

### 2.5.2 Chemikalien und Zusatzlösungen für die Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Für die Durchführung der H.E.-Färbung wurden Chemikalien und Zusatzlösungen von der Firma VWR, Langenfeld, verwendet.

Hämatoxylin	1g Hämatoxylin (kristallin)
künstliches Reifungsmittel	0,2g NaJo <sub>3</sub>
Aluminiumkaliumsulfatdodecahydrat	50g Kalialau, 50g Chloralhydrat
Monohydrat	1g Zitronensäure
ad 1000ml aqua dest.	

*Tabelle 6: Zusammensetzung der Kernfarbe Hämatoxylin nach Mayer*

### 2.5.3 Geräte und weitere Materialien

Folgende Geräte und Materialien wurden in der vorliegenden Arbeit verwendet:

Geräte	Firma
Analysesoftware analySIS <sup>®</sup> Image Processing	Soft Imaging System GmbH, Münster
Kamera Olympus DP 70	Olympus Optical Co. GmbH, Hamburg
Mikroskop BX41 System-Mikroskop	Olympus Optical Co. GmbH, Hamburg
Schlittenmikrotom SM 2000R	Leica Microsystems GmbH, Bensheim
Wasserstreckbad HI 1210	Leica Microsystems GmbH, Bensheim
Inkubator Heraeus-B6030, Heraeus	VWR International GmbH, Langenfeld
Einbettautomat STP120	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich

*Tabelle 7: Eingesetzte Geräte*

Verbrauchsmaterialien	Firma
Objektträger Superior	Marienfeld GmbH + Co. KG, Lauda-Königshofen
Deckgläser Superior	Marienfeld GmbH + Co. KG, Lauda-Königshofen
Einbettkassetten Histosette RII	VWR International GmbH, Langenfeld
Einmalskalpelle Feather, Fig.10	Feather Safety Razor Co., Köln
Pipetten Eppendorf-Research R	Eppendorf GmbH, Hamburg
Mikrotomklingen SEC 35	Feather Safety Razor Co., Köln
Microscopy Aquatex	VWR International GmbH, Langenfeld

*Tabelle 8: Eingesetzte Materialien*

Folgende Lösungen und Chemikalien wurden zur Durchführung des Experiments benötigt:

Puffer/ Lösungen	Zusammensetzung
TRIS-Stammlösung, pH 7,6	6,1g Tris-Base + 50ml aqua dest.; 37ml 1 N HCL + 1000ml aqua dest.
TRIS-Puffer pH 7,4-7,6	4,0g NaCl + 50ml Tris-Stammlösung + 500ml aqua dest.
PBS-Puffer pH 7,2-7,4	8,5g NaCl + 1,27g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> + 0,39g NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> + 1000ml aqua dest.
Converter-AP/ Magermilchpuffer (1:1)	3,03g Tris + 2,19g NaCl + 2,5g Milchpulver + 250ml aqua dest.; 500µl Magermilchpuffer + 500µl Converter-AP

*Tabelle 9: Zusammensetzung der verwendeten Puffer und Lösungen*



<b>Chemikalien</b>	<b>Firma</b>
Isopropanylalkohol	VWR International GmbH, Langenfeld
Xylol	VWR International GmbH, Langenfeld
Formaldehyd Roti R-Histofix 4% pH 7,0	Carl Roth GmbH + Co., Karlsruhe
Aqua destillata Seradest Formula 2000	Labomedic, Bonn

*Tabelle 10: Weitere verwendete Chemikalien*

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Histologische Auswertung

Zunächst wurden die Hämatoxylin-Eosin-gefärbten Gewebeproben der Vena saphena magna unter dem Lichtmikroskop beurteilt. Dabei wurden nur Venen in die Auswertung mit einbezogen, die eine intakte Venenwand aufwiesen. Besonders kritisch wurde das Endothel beurteilt, da dieses sehr sensibel auf äußere Manipulationen reagiert. Dieses musste zusammenhängend und durfte nicht abgelöst sein. Mit Hilfe der H.E.-Schnitte war die genaue Abgrenzung der einzelnen Schichten voneinander möglich. Hierbei wurde vor allem auf die genaue Abgrenzung zwischen Endothel und Subendothel geachtet.

Nun wurden die histologischen Schnitte nach der immunhistochemischen TUNEL-Färbung mit Hilfe der Software analySIS® Image Processing systematisch ausgewertet. Von den TUNEL-gefärbten Präparaten wurden für die quantitative Bestimmung jeweils vier Gesichtsfelder der einzelnen Wandschichten Endothel, Subendothel, Media und Adventitia fotografiert. Aus diesen vier Gesichtsfeldern wurde die Gesamtzellzahl der einzelnen Zellschichten (ohne die apoptotischen Zellkerne mitzuzählen) detektiert. Anschließend wurden die TUNEL-positiven Zellen bestimmt. Aus den jeweils ausgewerteten Gesichtsfeldern wurden nun die Mittelwerte für den jeweiligen Zeitpunkt und die entsprechende Venenwandschicht bestimmt. Die Anzahl der TUNEL-positiven Zellkerne wurde in Verhältnis zu der Gesamtzellzahl gesetzt. Der daraus resultierende Wert wurde als Apoptoseindex bezeichnet. Des Weiteren wurde die Standardabweichung des Apoptoseindexes berechnet.

#### 3.2. Statistik

Die oben aufgeführten Ergebnisse zeigten im zeitlichen Verlauf unterschiedlich steigende und sinkende Apoptoseraten. Außerdem unterschied sich die Apoptoserate der verschiedenen Wandschichten zwischen der Z44- und der Via Span-Lösung.

Die erhobenen Daten wurden mit Hilfe der Signifikanzberechnung statistisch ausgewertet um festzustellen, ob die Zeit einen signifikanten Einfluss auf die Apoptoserate hat.

Des Weiteren wurde ermittelt, ob sich die Apoptoserate der einzelnen Wandschichten in den beiden Lösungen signifikant voneinander unterscheidet.

### **3.3 Apoptoseraten in beiden Lösungen**

Die quantitative Auswertung der Venengrafts, die in der Z44-Lösung lagerten, zeigte für die einzelnen Wandschichten unterschiedliche Zeitverläufe. Die Apoptoserate stieg im Endothel und der Adventitia im zeitlichen Verlauf an. In den Schichten des Subendothels und der Media zeigte sich ebenfalls ein Anstieg der Apoptoserate vom Zeitpunkt 30 Minuten zum Zeitpunkt 60 Minuten. Die Apoptoserate des Zeitpunktes 90 Minuten war sowohl im Subendothel als auch in der Media geringer als zum Zeitpunkt 60 Minuten. Die Werte in den Grenzschichten Endothel und Adventitia zeigten deutlich höhere Anstiegsraten im Vergleich zum Subendothel und zur Media.

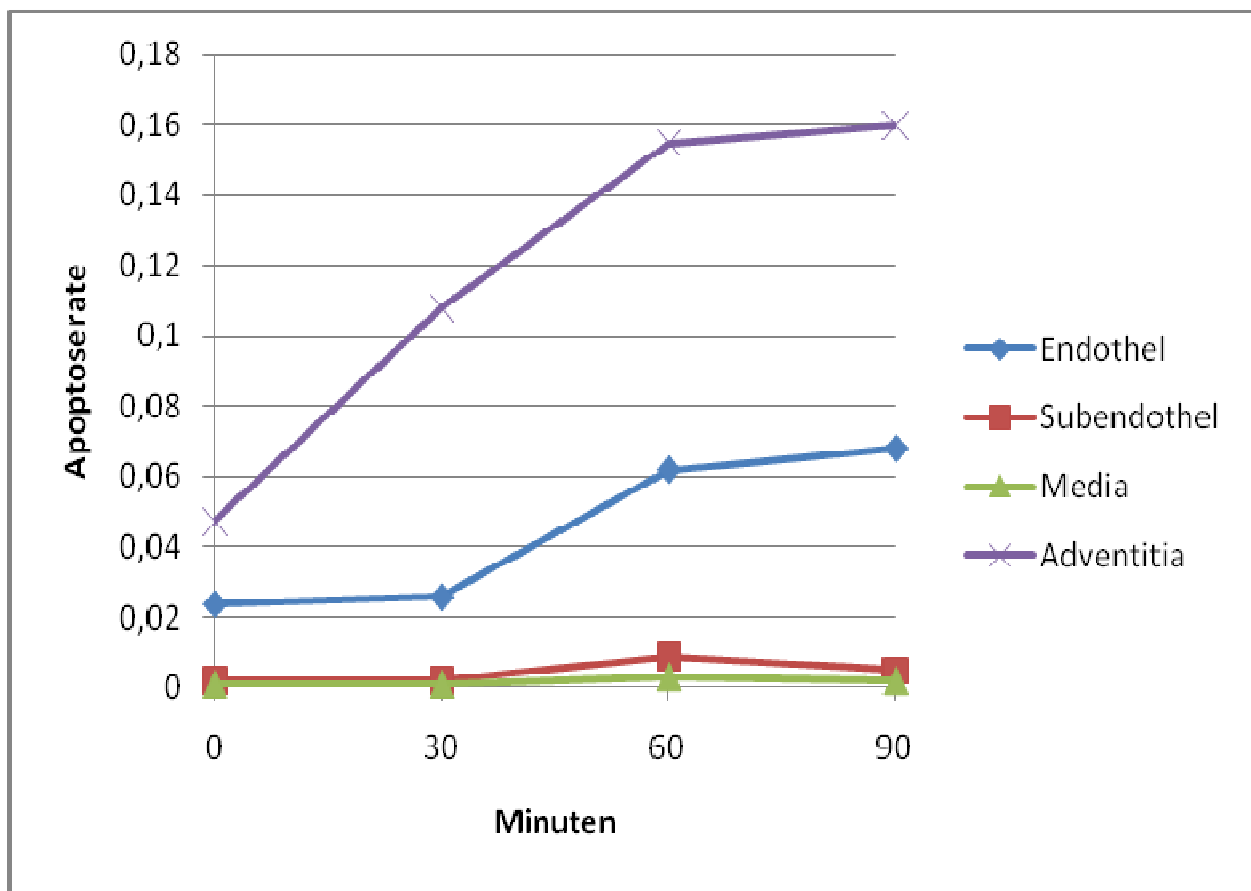


Abbildung 5: Zeitlicher Verlauf der mittleren Apoptoseraten ( $\bar{x}$ ) im Endothel, Subendothel, Media und Adventitia in der Z44-Lösung inkubierten Venen bei 4°C

Die quantitative Auswertung der Venengrafts, die in der Via Span-Lösung lagerten, zeigte für die einzelnen Wandschichten ebenfalls unterschiedliche Zeitverläufe. Im Endothel war die Apoptoserate zum Zeitpunkt 0 Minuten etwas höher als zum Zeitpunkt 30 Minuten. Zum Zeitpunkt 60 und 90 Minuten stieg sie an. In der Adventitia war im zeitlichen Verlauf eine steigende Apoptoserate zu beobachten. Im Subendothel sank sie vom Zeitpunkt 0 Minuten zum Zeitpunkt 30 Minuten ab. Nach 60 und 90 Minuten stieg die Apoptoserate an und war für beide Zeitpunkte identisch. In der Media war die Apoptoserate für den Zeitpunkt 0 Minuten höher als zum Zeitpunkt 30 Minuten. Zum Zeitpunkt 60 Minuten stieg sie leicht an und fiel dann bei Zeitpunkt 90 Minuten wieder ab.

Identisch zur Z44-Lösung zeigten die Werte in den Grenzschichten Endothel und Adventitia deutlich höhere Anstiegsraten im Vergleich zum Subendothel und zur Media.

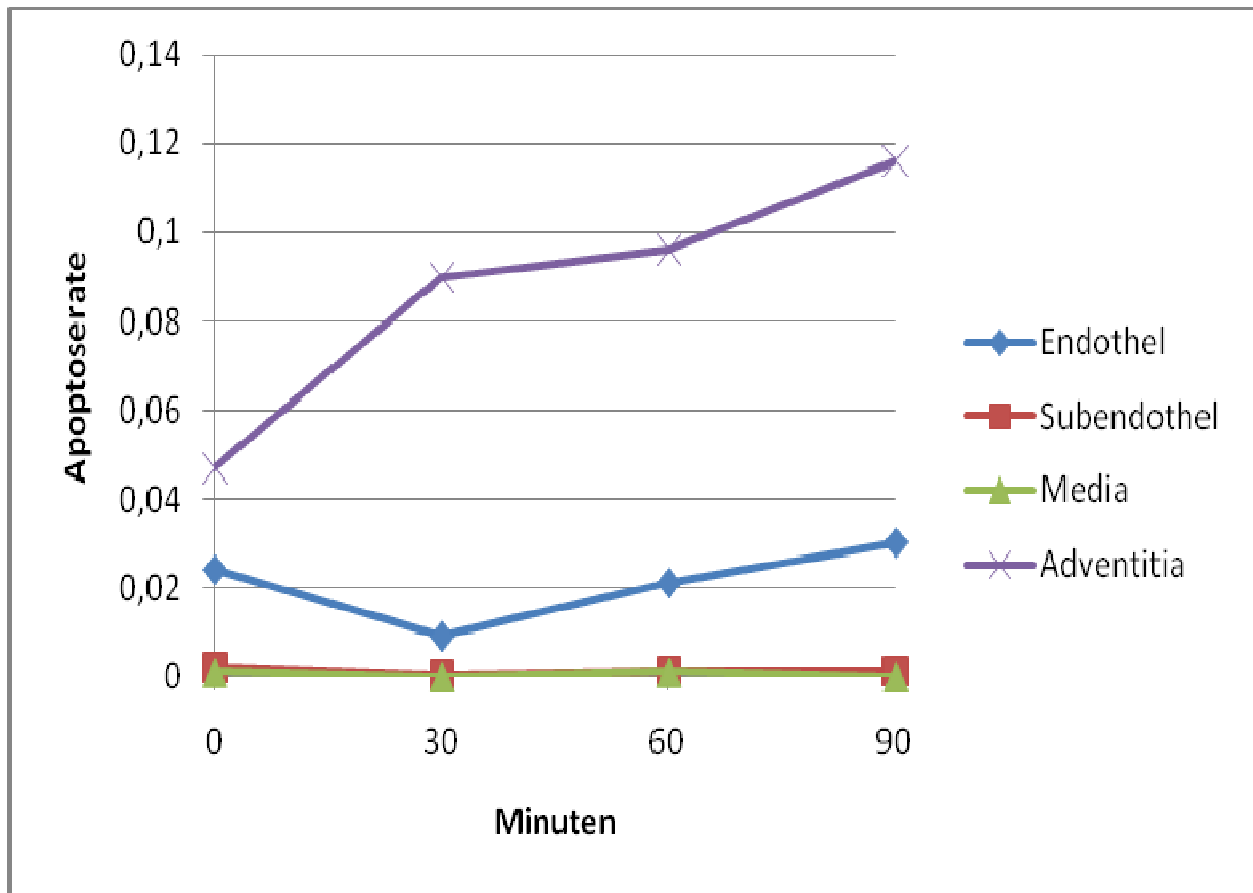


Abbildung 6: Zeitlicher Verlauf der mittleren Apoptoseraten ( $\bar{x}$ ) im Endothel, Subendothel, Media und Adventitia in der Via Span-Lösung inkubierten Venen bei 4°C

Die einzelnen Apoptoseraten sind in der Tabelle 11 zusammengefasst.

Solution	Time	Endothel	Subendothel	Media	Adventitia
Z44	0	0,024	0,002	0,001	0,047
Z44	30	0,026	0,002	0,001	0,108
Z44	60	0,062	0,009	0,003	0,155
Z44	90	0,068	0,005	0,002	0,16
Via Span	0	0,024	0,002	0,001	0,047
Via Span	30	0,009	0,0003	0	0,09
Via Span	60	0,021	0,001	0,001	0,096
Via Span	90	0,03	0,001	0,0001	0,116

*Tabelle 11: Mittlere Apoptoseraten ( $\bar{x}$ ) der Venensegmente in Abhängigkeit von der verwendeten Inkubationslösung und der Ischämiezeit*

### 3.4 Apoptoseraten in den einzelnen Wandschichten

#### 3.4.1 Endothel

Die Apoptoserate lag in den venösen Grafts bei der Entnahme (0 Minuten) im Endothel bei 2,4%. In der Z44-Lösung stieg die Apoptoserate nach 30 Minuten auf einen Wert von 2,6% an. Es zeigte sich ein weiterer Anstieg im zeitlichen Verlauf. Nach 60 Minuten wurde eine Apoptoserate von 6,2% beobachtet und am Ende des Untersuchungsraumes nach 90 Minuten ergab sich ein Wert von 6,8%.

In der Via Span-Lösung lag die Apoptoserate nach 30 Minuten bei 0,9%. Im weiteren zeitlichen Verlauf wurde eine Rate von 2,1% zum Zeitpunkt 60 Minuten ermittelt. Am Ende des Beobachtungszeitraumes nach 90 Minuten lag die Apoptoserate bei 3,0%.

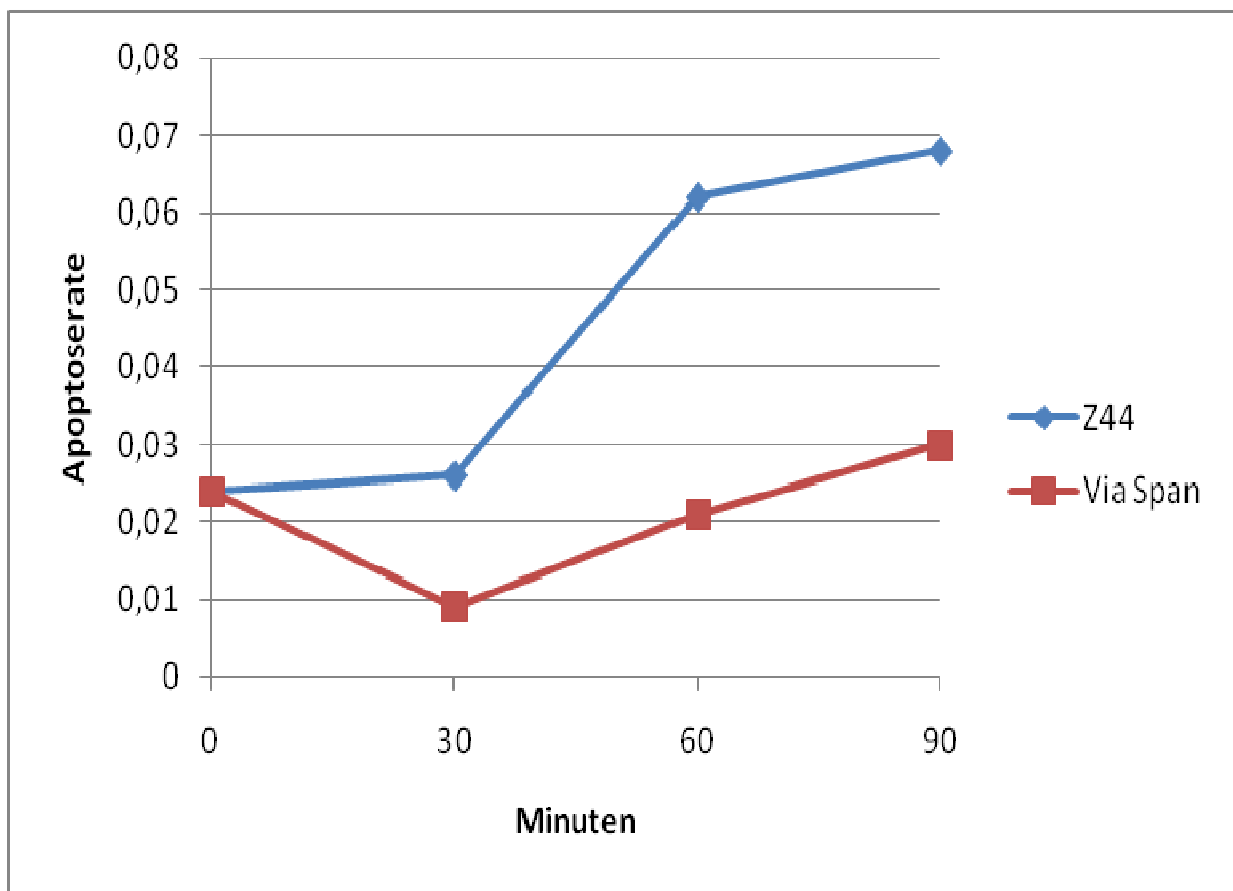


Abbildung 7: Mittlere Apoptoseraten ( $\bar{x}$ ) im Endothel in Abhängigkeit von der Ischämiezeit und dem Inkubationsmedium

Gruppe	Apoptoserate	Standardabweichung	N
<b>Endothel 0 min</b>			
Z44	0,024	0,05	30
Via Span	0,024	0,05	30
<b>Endothel 30 min</b>			
Z44	0,026	0,036	30
Via Span	0,009	0,024	30
<b>Endothel 60 min</b>			
Z44	0,062	0,084	30
Via Span	0,021	0,03	30
<b>Endothel 90 min</b>			
Z44	0,068	0,065	30
Via Span	0,03	0,037	30

Tabelle 12: Apoptoseraten ( $\bar{x} \pm SD$ ) in Abhängigkeit von der Zeit und dem verwendeten Inkubationsmedium

Im Endothel zeigte sich nach statistischer Auswertung in der Z44-Lösung zwischen den Zeitpunkten 30 und 90 Minuten ( $p=0,001$ ) und den Zeitpunkten 30 und 60 Minuten ( $p=0,009$ ) ein signifikanter Unterschied ( $p<0,05$ ). In der Via Span-Lösung wurde zwischen den Zeitpunkten 30 und 90 Minuten ebenfalls ein signifikanter Unterschied mit  $p=0,002$  ermittelt. Zwischen den Zeitpunkten 60 und 90 Minuten konnte weder in der Z44- noch in der Via Span-Lösung ein signifikanter Unterschied aufgezeigt werden. Der p-Wert lag jeweils bei  $p>0,05$ .

Des Weiteren unterschieden sich die Apoptoseraten zwischen den Lösungen Z44 und Via Span im Endothel signifikant voneinander. Der ermittelte p-Wert nach statistischer Auswertung lag zum Zeitpunkt 30 Minuten bei  $p=0,024$  und zum Zeitpunkt 60 Minuten bei  $p=0,016$ . Zum Zeitpunkt 90 Minuten erhielt man einen p-Wert von 0,014.



### 3.4.2 Subendothel

Im Subendothel zeigte sich direkt nach der Entnahme der Venengrafts eine Apoptoserate von 0,2%. In der Z44-Lösung wurden für den Zeitpunkt 30 Minuten 0,2% apoptotisch veränderte Zellen beobachtet. Der Wert zum Zeitpunkt 60 Minuten lag bei 0,9%. Schließlich wurde eine Apoptoserate von 0,5% zum Schluss des Beobachtungszeitraumes nach 90 Minuten detektiert.

In der Via Span-Lösung lag der Wert zum Zeitpunkt 30 Minuten im Subendothel bei 0,03%. Die Rate stieg zum Zeitpunkt 60 Minuten leicht auf einen Wert von 0,1% an und blieb auch zum Ende des Beobachtungszeitraumes nach 90 Minuten bei 0,1%.

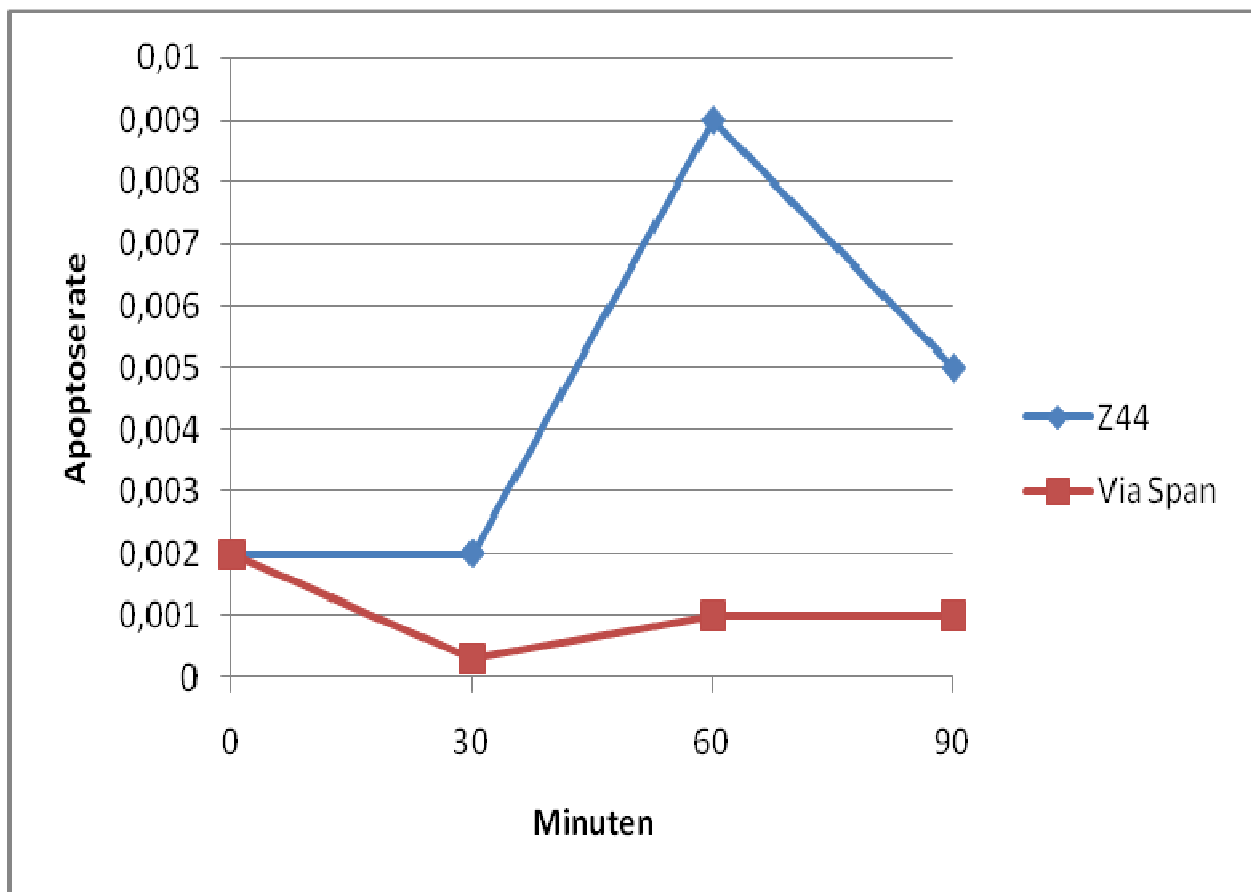


Abbildung 8: Mittlere Apoptoseraten ( $\bar{x}$ ) im Subendothel in Abhängigkeit von der Ischämiezeit und dem Inkubationsmedium

Gruppe	Apoptoserate	Standardabweichung	N
<b>Subendothel 0 min</b>			
Z44	0,002	0,007	30
Via Span	0,002	0,007	30
<b>Subendothel 30 min</b>			
Z44	0,002	0,007	30
Via Span	0,0003	0,001	30
<b>Subendothel 60 min</b>			
Z44	0,009	0,031	30
Via Span	0,001	0,004	30
<b>Subendothel 90 min</b>			
Z44	0,005	0,014	30
Via Span	0,001	0,003	30

*Tabelle 13: Apoptoseraten ( $\bar{x} \pm SD$ ) in Abhängigkeit von der Zeit und dem verwendeten Inkubationsmedium*

Im Subendothel zeigte sich weder in der Z44- noch in der Via Span-Lösung nach statistischer Auswertung ein signifikanter Zeiteinfluss auf die steigenden Apoptoseraten ( $p > 0,05$ ).

Es konnte zum Zeitpunkt 30 Minuten ( $p = 0,457$ ) und zum Zeitpunkt 90 Minuten ( $p = 0,248$ ) kein signifikanter Unterschied ( $p < 0,05$ ) zwischen Z44- und Via Span-Lösung bezüglich der Apoptoseraten ermittelt werden. Zum Zeitpunkt 60 Minuten wurde ein signifikanter Unterschied ( $p = 0,036$ ) zwischen beiden Lösungen festgestellt.

### 3.4.3 Media

In der Media zeigte sich zu Beginn des Untersuchungszeitraumes eine Apoptoserate von 0,1%. In der Z44-Lösung erhielt man für den Zeitpunkt 30 Minuten ebenfalls eine Rate von 0,1%. Nach weiteren 30 Minuten stieg die Rate auf 0,3% an. Zum Zeitpunkt 90 Minuten fiel sie leicht auf einen Wert von 0,2%.

In der Via Span-Lösung waren zum Zeitpunkt 30 Minuten keine TUNEL-positiven Zellen nachweisbar. Die Apoptoserate nach 60 Minuten betrug 0,1%. Nach 90 Minuten wurden 0,01% apoptotisch veränderte Zellen ermittelt.

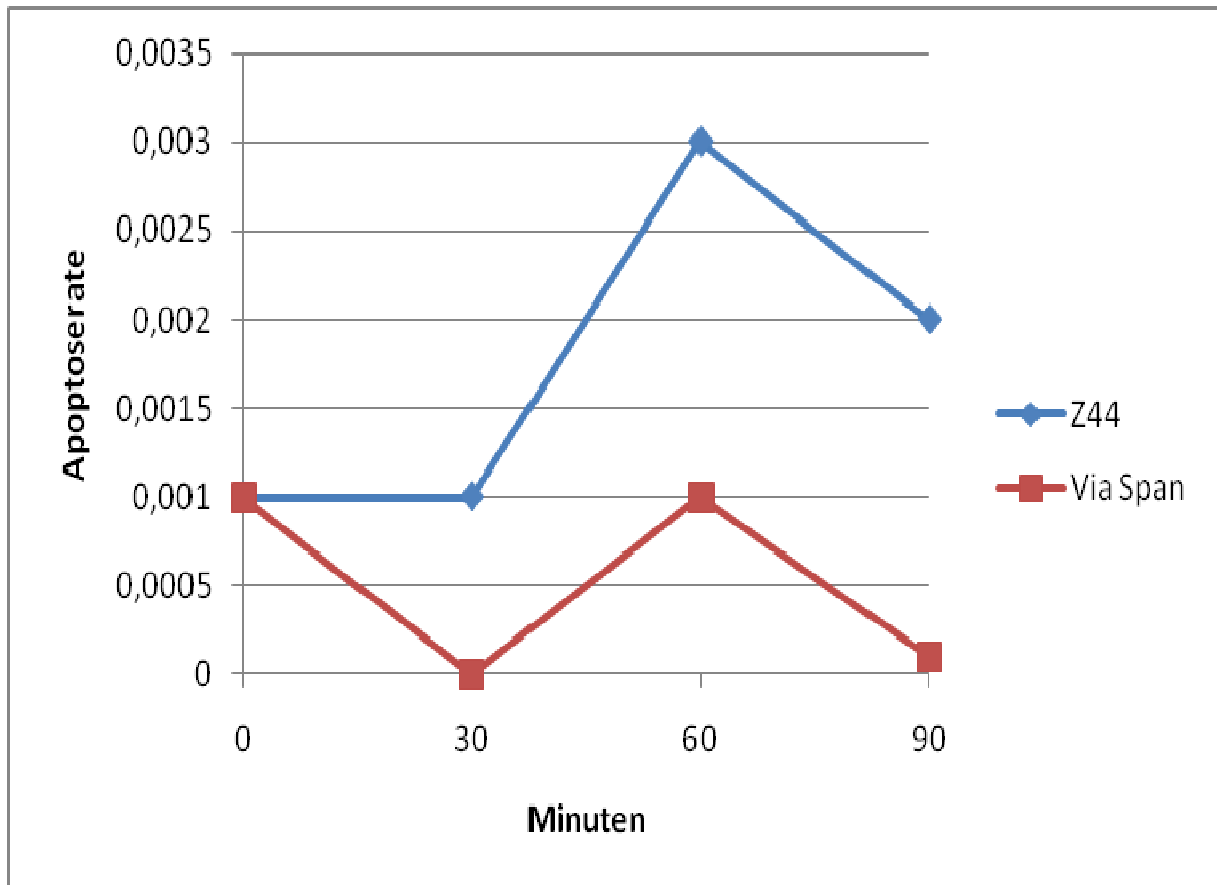


Abbildung 9: Mittlere Apoptoserate ( $\bar{x}$ ) in der Media in Abhängigkeit von der Ischämiezeit und dem Inkubationsmedium

Gruppe	Apoptoserate	Standardabweichung	N
<b>Media 0 min</b>			
Z44	0,001	0,003	30
Via Span	0,001	0,003	30
<b>Media 30 min</b>			
Z44	0,001	0,004	30
Via Span	0	0	30
<b>Media 60 min</b>			
Z44	0,003	0,009	30
Via Span	0,001	0,002	30
<b>Media 90 min</b>			
Z44	0,002	0,004	30
Via Span	0,0001	0,001	30

*Tabelle 14: Apoptoseraten ( $\bar{x} \pm SD$ ) in Abhängigkeit von der Zeit und dem verwendeten Inkubationsmedium*

In der Media zeigte sich nach statistischer Auswertung kein signifikanter Zeiteinfluss auf die steigenden Apoptoseraten in der Z44- und Via Span-Lösung ( $p > 0,05$ ).

Es konnte ebenfalls für keinen Zeitpunkt ein signifikanter Unterschied zwischen Z44- und Via Span-Lösung hinsichtlich der Apoptoseraten festgestellt werden ( $p > 0,05$ ).

### 3.4.4 Adventitia

In der Adventitia lag die Apoptoserate in den nativen Grafts zum Zeitpunkt 0 Minuten bei 4,7%. In der Z44-Lösung stieg der Wert nach 30 Minuten auf 10,8% an. Es zeigte sich ein weiterer Anstieg im zeitlichen Verlauf. Nach 60 Minuten wurde eine Rate von 15,5% ermittelt. Am Ende der Untersuchung nach 90 Minuten wurden 16,0% apoptotisch veränderte Zellen detektiert.

In der Via Span-Lösung wurde für den Zeitpunkt 30 Minuten eine Rate von 9,0% ermittelt.

Es zeigten sich weitere steigende Apoptoseraten nach 60 Minuten mit 9,6% und nach 90 Minuten mit 11,6%.

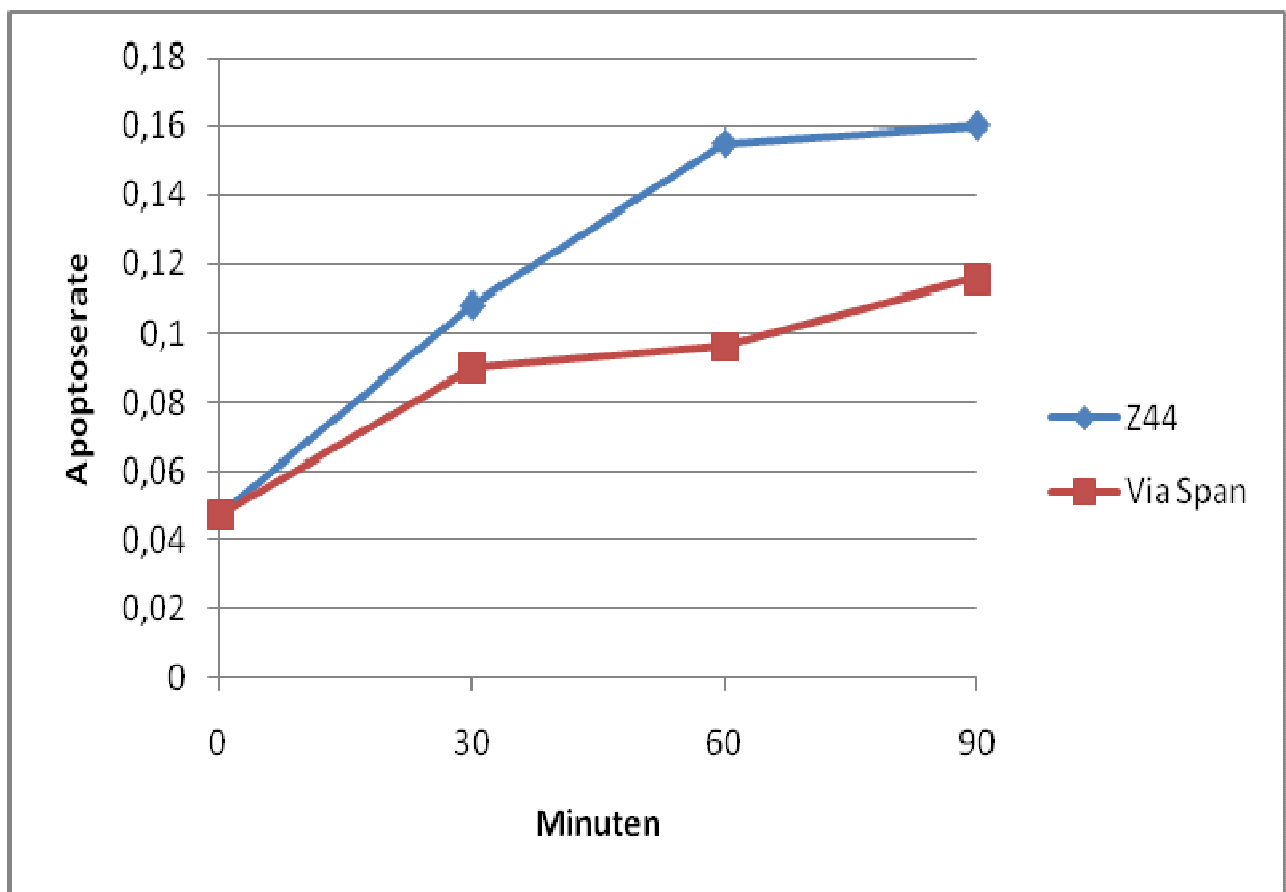


Abbildung 10: Mittlere Apoptoserate ( $\bar{x}$ ) in der Adventitia in Abhängigkeit von der Ischämiezeit und dem Inkubationsmedium

Gruppe	Apoptoserate	Standardabweichung	N
<b>Adventitia 0min</b>			
Z44	0,047	0,07	30
Via Span	0,047	0,07	30
<b>Adventitia 30min</b>			
Z44	0,108	0,11	30
Via Span	0,09	0,114	30
<b>Adventitia 60 min</b>			
Z44	0,155	0,151	30
Via Span	0,096	0,082	30
<b>Adventitia 90 min</b>			
Z44	0,16	0,132	30
Via Span	0,116	0,098	30

*Tabelle 15: Apoptoseraten ( $\bar{x} \pm SD$ ) in Abhängigkeit von der Zeit und dem verwendeten Inkubationsmedium*

In der Adventitia konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Zeitpunkten festgestellt werden ( $p > 0,05$ ).

Des Weiteren wurde zu keinem Zeitpunkt ein signifikanter Unterschied zwischen Z44- und Via Span-Lösung bezüglich der steigenden Apoptoseraten aufgezeigt ( $p > 0,05$ ).

### 3.4.5 Gegenüberstellung von Apoptoserate und Kaliumkonzentration der Lösungen

Die Apoptoserate des HTK Lösung nach Bretschneider-Kollektivs wurde der Dissertationsschrift von Guido Zintl, Erscheinungsjahr 2008, entnommen.

Die Kaliumkonzentrationen der drei untersuchten Lösungen unterscheiden sich deutlich voneinander und es scheint, dass Kalium einen Einfluss auf das Endothel ausübt.

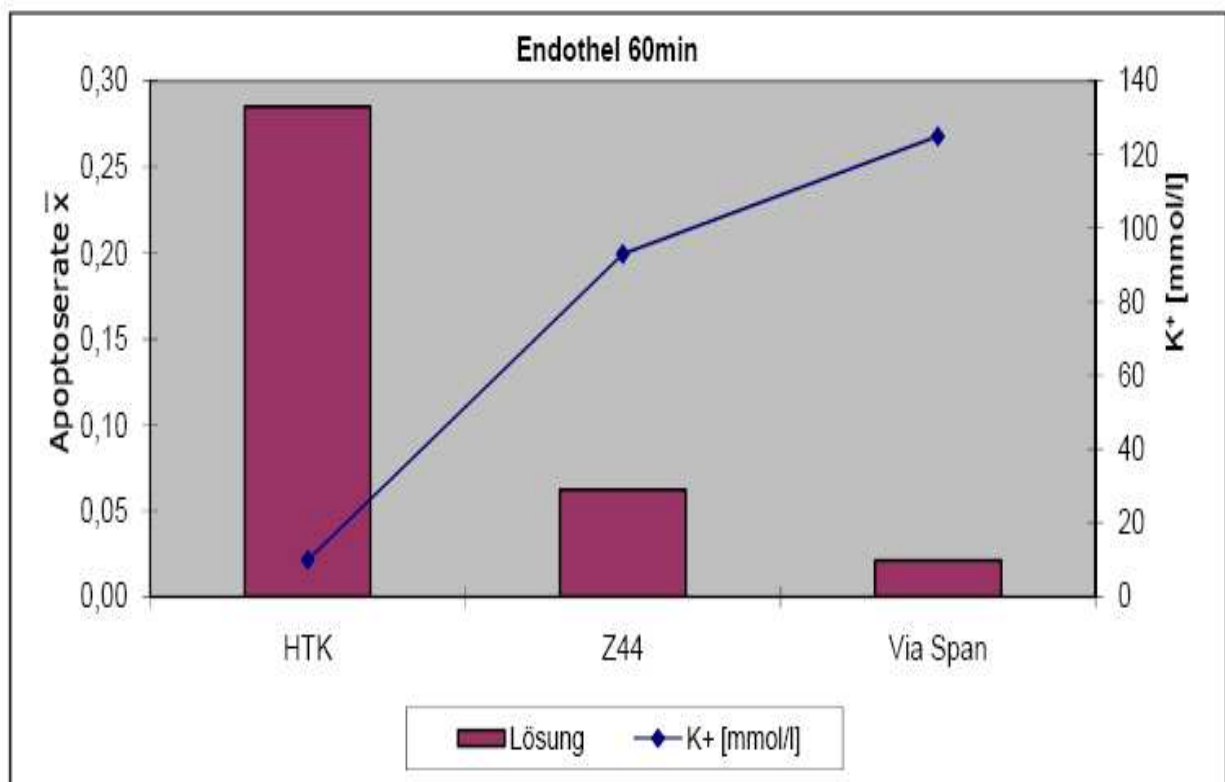


Abbildung 11: Abhängigkeit der mittleren Apoptoserate ( $\bar{x}$ ) im Endothel nach 60 minütiger Ischämie bei 4°C von der Kaliumkonzentration des Inkubationsmediums

## 4. Diskussion

Die hohe Okklusionsrate im Langzeitverlauf der venösen Grafts stellt ein wesentliches Problem in der Herzchirurgie dar. Bislang weisen lediglich arterielle Grafts eine geringe Rate an signifikanten Stenosen im Langzeitverlauf auf (Fitzgibbon et al. , 1996).

Bei der Durchführung eines koronarchirurgischen Eingriffes werden meist mehrere Grafts benötigt. Da die Anzahl an verwendbaren arteriellen Grafts begrenzt ist, werden überwiegend venöse Grafts verwendet (Fitzgibbon et al. , 1996).

Das Grundleiden der Patienten, die koronare Herzkrankheit, neigt zur Progredienz (Emmrich, 1998). Es besteht demnach die Notwendigkeit, Grafts für die Revaskularisierung zu verwenden, die niedrige Stenoseraten und gute Langzeitergebnisse aufweisen. Dadurch soll eine Reoperation auf Grund stenosierter oder verschlossener Grafts aufgeschoben werden.

Die Langzeitergebnisse der Koronarchirurgie werden durch drei Hauptfaktoren bestimmt: die Progredienz der koronaren Herzkrankheit, die Adaptation der Vene im koronaren Gefäßsystem und die biologischen Eigenschaften des venösen Grafts. Wesentliche Verletzungen des venösen Grafts geschehen während der operativen Entnahme. Intraoperative Ischämie und Druckerhöhung während der Dichtigkeitsprüfung führen zu strukturellen Schäden in der Endotheloberfläche der Vene (Zerkowski et al., 1993).

Die Schädigung des Endothels ist ausschlaggebend für die weiteren Veränderungen der Graftwand (Davies et al. , 1994). Diese Graftwandveränderungen beeinflussen das postoperative Thromboserisiko, die Intimahyperplasie sowie die beschleunigt einsetzende Arteriosklerose negativ.

Heute gehen alle Bemühungen dahin, dass der Endothelschaden auf ein Minimum reduziert wird. Der Einsatz einer geeigneten Konservierungslösung stellt einen wichtigen Aspekt in der Vermeidung von Endothelschäden dar (Zerkowski et al. , 1993).

Das Ziel der vorliegenden Arbeit besteht in der Ermittlung und Lokalisation der Apoptose in den venösen Grafts nach Aufbewahrung in zwei verschiedenen Konservierungslösungen, Via Span und Z44, zu definierten Zeiträumen.

Eine effektive Konservierungslösung zur Überbrückung des ischämischen Intervalls sollte vier Forderungen erfüllen:



- 1.) Vermeidung eines Zellödems
- 2.) Limitierung einer Hyperkalzämie der Zelle
- 3.) Antagonisierung freier Radikale
- 4.) Vermeidung einer Kontraktur aufgrund des Energieverlustes der Zelle (Garlicki, 2003).

Außerdem sollte ein ideales Medium Endothelzellen und glatte Muskelzellen schützen, indem es die chemischen und ischämischen Schäden minimiert (Cavallari et al. , 1997).

Die Wahl der Konservierungslösung führt zu kontroversen Diskussionen bezüglich der Inhaltsstoffe und der Dauer der Konservierung, um die Entstehung von Thrombose und Intimahyperplasie zu minimieren (Shuhaiber et al. , 2002). Es wurden in Versuchsreihen verschiedene Lösungen und Medien, unter anderem die Lösungen Celsior, Euro-Collins, St. Thomas, Bretschneider, Via Span und Eigenblut, auf ihre Wirksamkeit untersucht (Alamanni et al. , 2002; Wagner, 1990).

Neben der unterschiedlichen Zusammensetzung der Lösung kann auch die Lösungstemperatur einen schädigenden Einfluss auf die Endothelzellen ausüben. So wurde in einer Studie gezeigt, dass in Venen 25 bis 50% der Endothelzellen verloren gehen, wenn sie in einer 28°C temperierten Kochsalzlösung aufbewahrt werden (Gundry et al., 1980; Solberg et al., 1992). In einer weiteren Studie wurde gezeigt, dass die optimale Temperatur der Via Span-Lösung für den Erhalt der endothelialen Funktion  $\leq 10^{\circ}\text{C}$  sein sollte (Mankad et al., 1992). Auf Grund der heute allgemein gültigen Meinung, dass die Kühlung der Lösung durch die Minimierung des Zellmetabolismus einen protektiven Effekt bewirkt (Davies und Hagen, 1995; Gundry et al. , 1980), wird in der vorliegenden Arbeit 4°C kalte Z44- und Via Span-Lösung verwendet.

Die Via Span-Lösung, auch University of Wisconsin Lösung genannt, wurde in den 80er Jahren als eine intrazelluläre Lösung für die Pankreastransplantation entwickelt (Wahlberg et al. , 1986). Die Effektivität dieser Lösung ist für die Konservierung von Herz und Lunge bewiesen (Rinaldi et al. , 1995; Swanson et al. , 1988).

Die Via Span-Lösung wurde ebenfalls für die Preservation von Vena saphena magna-Grafts untersucht (Shuhaiber et al. , 2002).

In einer Studie wurde die Via Span-Lösung mit normaler Kochsalzlösung und Eigenblut bezüglich ihrer Auswirkung auf die glatten Muskelzellen verglichen. Die Funktion der glatten Muskelzellen der Venen, die in der Via Span-Lösung lagerten, blieb im Vergleich zu den Venen, die in der Kochsalzlösung oder im Eigenblut konserviert wurden, erhalten. Zu den Beobachtungskriterien zählte die Dicke der Intima und die Reaktion auf Acetylcholin, Nitroprussid und Noradrenalin

(Mankad et al. , 1992). In einer weiteren Studie wurde Via Span mit der Euro-Collins-Lösung als Konservierungsmittel für Gefäßendothel verglichen. In der Via Span-Lösung blieben nach 24 Stunden 99% der Zellen intakt und nach 72 Stunden zeigten sich keine strukturellen oder intrazellulären Veränderungen (Barner und Fischer, 1990). Eine weitere Studie verglich die Via Span-Lösung mit Celsior, Euro-Collins, St. Thomas sowie dem Medium M199 bezüglich ihrer Auswirkungen auf Endothelzellen. Dabei zeigte Via Span neben Celsior und dem Medium M199 keinen signifikanten Endothelzellverlust während eines Beobachtungszeitraumes von 24 und 48 Stunden unter hypothermen Bedingungen (Alamanni et al. , 2002).

Via Span scheint in der Lage zu sein die Prävention der Endothelzellen zu gewährleisten. Das Ausmaß der Intimahyperplasie hängt maßgeblich vom Umfang des primären Endothelschadens ab (Motwani und Topol, 1998).

In der vorliegenden Arbeit wurde neben der Via Span-Lösung die Z44-Lösung als Preservationslösung untersucht. Bisher wurde keine Studie zu dieser Lösung durchgeführt.

Nach den vorliegenden Ergebnissen zeigen sich in den verschiedenen Gefäßwandschichten und den beiden Lösungen Z44 und Via Span unterschiedlich hohe Apoptoseraten. Das Endothel und die Adventitia zeigen im Vergleich zum Subendothel und zur Media in beiden Lösungen deutlich höhere Apoptoseraten. Dies könnte daran liegen, dass sowohl das Endothel als auch die Adventitia dem direkten Kontakt der Lösung ausgesetzt sind. Die Apoptoserate ist in den Venen, die in der Z44-Lösung konserviert wurden, zu jedem Zeitpunkt und in jeder Gewebsschicht höher als die Venen der Via Span-Lösung.

Das Endothel weist direkt nach der Entnahme eine Apoptoserate von 2,4% auf. Nach 30 Minuten liegt der Anteil der apoptotisch veränderten Zellen in der Via Span-Lösung bei 0,9%. In der Z44-Lösung beobachtet man zu diesem Zeitpunkt einen Wert von 2,6%. Im weiteren zeitlichen Verlauf steigt die Rate in beiden Lösungen an. Zum Zeitpunkt 90 Minuten liegt die Rate der apoptotischen Zellen in der Via Span-Lösung bei 3,0%. In der Z44-Lösung wird zum Zeitpunkt 90 Minuten eine Apoptoserate von 6,8% detektiert. Es zeigt sich, dass die Rate an apoptotisch veränderten Zellen in der Via Span-Lösung zum Zeitpunkt 0 Minuten höher ist als zum Zeitpunkt 30 Minuten. Im weiteren zeitlichen Verlauf steigt die Apoptoserate an. In der Z44-Lösung steigt der Anteil der apoptotisch detektierten Zellen vom Zeitpunkt 0 Minuten proportional an.

Die Adventitia zeigt von allen Schichten sowohl in der Via Span-Lösung als auch in der Z44-Lösung zu jedem gemessenen Zeitpunkt die höchste Apoptoserate. Direkt nach der Entnahme

liegt sie bereits bei 4,7%. Dies lässt sich mit der vorangegangenen chirurgischen Präparation erklären. Die Apoptoserate nimmt im Beobachtungszeitraum bei längerer Lagerung weiter zu. Nach 30 Minuten liegt der Anteil der apoptotischen Zellen in der Via Span-Lösung bei 9,0% und erreicht nach 90 Minuten einen Wert von 11,6%. In der Z44-Lösung liegt die Apoptoserate nach 30 Minuten bei 10,8%. Zum Zeitpunkt 90 Minuten werden 16,0% apoptotisch veränderte Zellen detektiert.

Die Zellen des Subendothels und der Media weisen im Vergleich zum Endothel und zur Adventitia in beiden Lösungen eine wesentlich geringere Apoptoserate auf. Dies könnte daran liegen, dass sie keinen direkten Kontakt zur Lösung haben. Im Subendothel liegt die Rate der apoptotisch detektierten Zellen direkt nach Entnahme bei 0,2%. Zum Zeitpunkt 30 Minuten liegt sie in der Via Span-Lösung bei 0,03%. Zum Zeitpunkt 60 und 90 Minuten wird eine Apoptoserate von jeweils 0,1% detektiert. Die Apoptoserate zum Zeitpunkt 0 Minuten liegt, wie im Endothel, höher als zum Zeitpunkt 30 Minuten. Sie steigt bei längerer Lagerung nicht weiter an. In der Z44-Lösung werden zum Zeitpunkt 30 Minuten 0,2% apoptotisch veränderte Zellen detektiert und am Ende des Beobachtungszeitraumes nach 90 Minuten 0,5%. Die Rate an apoptotischen Zellen bleibt zum Zeitpunkt 0 Minuten und 30 Minuten identisch und fällt vom Zeitpunkt 60 Minuten zum Zeitpunkt 90 Minuten leicht ab.

In der Media werden weniger apoptotisch veränderte Zellen im Vergleich zum Subendothel detektiert. Zum Zeitpunkt 0 Minuten liegt die Apoptoserate bei 0,1%, während zum Zeitpunkt 30 Minuten in den Venen der Via Span-Lösung keine apoptotisch veränderten Zellen detektiert werden. Nach 90 Minuten werden 0,01% apoptotisch veränderte Zellen aufgezeigt. In der Z44-Lösung liegt die Apoptoserate nach 30 Minuten bei 0,1% und steigt zum Zeitpunkt 90 Minuten auf 0,2% an.

Die statistische Auswertung ergibt, dass im Endothel zu jedem Zeitpunkt ein statistisch signifikanter Unterschied ( $p < 0,05$ ) zwischen den Lösungen Z44 und Via Span vorherrscht. Im Subendothel kann zum Zeitpunkt 60 Minuten ebenfalls ein statistischer Unterschied zwischen den Lösungen festgestellt werden ( $p = 0,036$ ). In der Media und Adventitia wird zu keinem Zeitpunkt ein signifikanter Unterschied aufgezeigt.

Einige Eigenschaften der Via Span-Lösung erlauben eine Aussage über das protektive Potential während der Preservation der venösen Grafts. Die Lösung enthält Laktobionate und Raffinose,

wodurch der extrazelluläre osmotische Druck erhöht und somit die Entwicklung eines Zellödems minimiert wird (Kajihara et al. , 2006).

Um die Bildung eines Zellödems zu verhindern, sollte die Konzentration an Impermeants zwischen 110-140mmol/l liegen (Belzer und Southard, 1988). Via Span enthält Laktobionate (100mmol/l) und Raffinose (30mmol/l) und minimiert damit das Risiko eines sich bildenden hypothermie-bedingten Zellödems (Cavallari et al. , 1997).

Das Vorhandensein von Magnesium, welches ein Kalzium Antagonist ist, verhindert eine Hyperkalzämie der Zelle (Garlicki, 2003). Magnesium stellt weiterhin einen potenten Vasodilatator sowohl durch endothelabhängige als auch durch endothelunabhängige Mechanismen dar und stabilisiert gleichzeitig die Membran (Longo et al., 2001; Yang et al., 2000).

Die in der Lösung enthaltenen Antioxidantien Glutathion, Laktobionate und Allopurinol schützen vor freien Radikalen. Dabei wird Glutathion als einer der effektivsten Radikalfänger beschrieben (Cavallari et al. , 1997; Garlicki, 2003). Dies ist von Bedeutung, da während des ischämischen Intervalls unter anderem freie Radikale produziert werden, die verschiedene Reaktionen auslösen (Kukreja und Hess, 1992). Sie inaktivieren die  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase, wodurch die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration ansteigt. Die dadurch entstehende Hyperkalzämie der Zelle führt zu einer verlängerten Membrandepolarisation und zu irreversiblen Schäden der Zelle (Garlicki, 2003). Die Oxidation der Membranlipide durch freie Radikale führt zu einer erhöhten Membranpermeabilität. Dies bewirkt eine Ödembildung in Endothelzellen und deren Dysfunktion (Garlicki, 2003). Dieser Effekt kann durch die in der Via Span-Lösung enthaltenen Antioxidantien minimiert werden. Der sinkende Energiegehalt unter hypothermen und ischämischen Bedingungen stellt einen weiteren wichtigen Faktor dar. Die Via Span-Lösung enthält Adenosin, welches die Zelle mit Substraten für die Regeneration des Adenosintriphosphates nach der hypothermen Phase versorgt (Cavallari et al. , 1997).

Ein weiterer Inhaltsstoff der Via Span-Lösung ist die Hydroxyäthylstärke. Sie erhöht den kolloidosmotischen Druck, der die Ausweitung des interstitiellen Raumes verhindert (Kajihara et al. , 2006). Auf der anderen Seite wird durch diese Substanz die Viskosität der Lösung erhöht (Garlicki, 2003). Dies könnte die Empfindlichkeit des koronaren Endothels beeinträchtigen (Menasche et al., 1994).

Die Via Span-Lösung enthält den Puffer  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , der der Bildung einer intrazellulären Azidose entgegenwirkt. Diese entwickelt sich während der ablaufenden anaeroben Glykolyse bei langer Ischämiezeit (Cavallari et al. , 1997).

Neben den oben aufgeführten Studien, die eine Protektionseigenschaft der Via Span-Lösung beschreiben, gibt es eine Debatte darüber, ob die endothelabhängige Vasodilatation durch die Via Span-Lösung negativ beeinflusst wird. In einigen Studien zeigte die Via Span-Lösung in Bezug auf die endothelabhängige Vasodilatation gute Ergebnisse (Abebe et al., 1993; Sorajja et al., 1997). In anderen Studien wurde dies allerdings nicht bestätigt (Anastasiou et al., 1997; Ingemansson et al., 1995; Stanke-Labesque et al., 1999).

Die Z44-Lösung enthält folgende Bestandteile, die eine protektive Eigenschaft darstellen könnten. Magnesium verhindert eine Hyperkalzämie der Zelle (Garlicki, 2003) und stellt weiterhin einen potenten Vasodilatator dar (Longo et al., 2001; Yang et al., 2000). Die Z44-Lösung enthält Puffer, unter anderem Histidin, die der Bildung einer intrazellulären Azidose entgegenwirken (Cavallari et al., 1997).

Die Kaliumkonzentration in Konservierungslösungen scheint einen erheblichen Einfluss auf das Endothel zu haben, der bis heute unzureichend geklärt ist. Eine Hyperkaliämie könnte eine Depolarisation des Ruhemembranpotentials induzieren und somit zu einem vermehrten Natrium- und Kalziumeinstrom infolge spannungsabhängiger Kanäle führen (Garlicki, 2003). Eine Studie zeigt, dass eine Lösung mit einer Kaliumkonzentration von mindestens 30mmol/l die endothelabhängige Serotonin-induzierte Vasodilatation aufhebt (Mankad et al., 1991). Im Gegensatz dazu zeigt eine andere Studie (Evora et al., 1992), dass eine Hyperkaliämie an sich die endothelabhängige Vasodilatation nicht signifikant modifiziert.

In einer weiteren Studie wurde die Kaliumkonzentration in der Via Span-Lösung von 129 mmol/l auf 25 mmol/l reduziert und es zeigte sich ein besserer Erhalt der Funktion des Endothels (Lee et al., 1996). Allerdings ergab eine Studie desselben Labors einige Zeit vorher keinen signifikanten Unterschied zwischen den Lösungen mit unterschiedlich hoher Kaliumkonzentration (Drinkwater et al., 1995). He et al. zeigte in mehreren Studien sowohl an Menschen als auch in experimentellen Tierversuchen, dass eine Kaliumkonzentration von mindestens 20 mmol/l eine selektive Minderung der EDHF-abhängigen Vasodilatation bewirkt (He, 1997; He und Yang, 1996; He und Yang, 1998; He et al., 1996; He et al., 1997). Allerdings wird der Einfluss des Kaliums sowohl durch die Temperatur der Lösung als auch durch die Dauer der Lagerung beeinflusst (Chang et al., 1997; Evora et al., 1992).

In einer früheren Untersuchung (Dissertationsschrift Guido Zintl, 2008) aus dieser Klinik wurde die HTK Lösung nach Bretschneider untersucht und die Apoptoserate auf gleiche Weise wie in der vorliegenden Arbeit bestimmt.

Die Apoptoserate der in HTK Lösung nach Bretschneider konservierten Venen ist im Endothel zu allen Zeitpunkten höher als die Rate der Via Span- und Z44-Lösung.

Die Kaliumkonzentrationen der drei untersuchten Lösungen HTK Bretschneider, Via Span und Z44 unterscheiden sich deutlich voneinander und es scheint, dass Kalium einen Einfluss auf das Endothel ausübt.

Abbildung 11 (vgl. Kapitel 3.4.5.) zeigt die Apoptoserate sowie die Kaliumkonzentrationen der einzelnen Lösungen exemplarisch am Endothel zum Zeitpunkt 60 Minuten. Die höchste Apoptoserate mit 28,5% weist die HTK Lösung nach Bretschneider auf, die eine Kaliumkonzentration von 10mmol/l enthält. Die Apoptoserate des HTK-Kollektivs wurde der Dissertationsschrift von Guido Zintl, Erscheinungsjahr 2008, entnommen. Die Z44-Lösung zeigt eine Apoptoserate von 6,2% mit einer Kaliumkonzentration von 93mmol/l. Die Via Span-Lösung mit einer Kaliumkonzentration von 125mmol/l weist eine Apoptoserate von 2,1% auf. Je höher die Kaliumkonzentration in den untersuchten Lösungen ist, desto weniger apoptotisch veränderte Zellen werden detektiert.

Apoptose wird bei kardiovaskulären Erkrankungen, zu denen die Arteriosklerose zählt, als wichtiger Pathomechanismus für die Progression der Erkrankung vermutet. Die Venenaskulopathie wird in direktem Zusammenhang mit der Apoptose gesehen. In der vorliegenden Arbeit wird die Apoptoserate bestimmt. Je höher die Anzahl an apoptotisch veränderten Zellen ist, desto größer ist der Gefäßschaden. In den Lösungen Z44 und Via Span finden sich frühischämische Zelltodergebnisse. Die Apoptoserate in der Via Span-Lösung ist allerdings kleiner als in der Z44-Lösung. Die Via Span-Lösung kann einen Gefäßschaden besser abwenden.

Anhand der oben aufgeführten Protektionseigenschaften der Via Span-Lösung können mehrere Hypothesen aufgestellt werden.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass die Apoptoserate im zeitlichen Verlauf steigt. Im Vergleich zu den anderen Lösungen, HTK Bretschneider und Z44, besteht aber für alle Zeitpunkte die niedrigste Rate an apoptotischen Zellen. Damit kann die Lagerung der venösen Grafts in der Via Span-Lösung einen Zellschaden minimieren.

Eine Reduktion des Endothelschadens könnte die thrombotischen Graftverschlüsse in der frühen postoperativen Phase reduzieren. Im weiteren postoperativen Verlauf könnte die hohe Anzahl der intakten Endothelzellen die einsetzende Intimahyperplasie reduzieren.

Nach den Ergebnissen dieser Arbeit zeigt die Adventitia der Venen, die in Via Span-Lösung konserviert wurden, ebenfalls eine niedrige Apoptoserate. Durch die Minimierung der induzierten Zellschäden in den Vasa vasorum der Adventitia könnten ischämische Zellschäden an glatten Muskelzellen reduziert werden. Das Ausmaß der Intimahyperplasie würde dadurch minimiert werden. Da die Intimahyperplasie in direktem Zusammenhang mit der frühzeitig auftretenden Arteriosklerose steht, würde diese ebenfalls später auftreten.

Die Lagerung der venösen Grafts in der Via Span-Lösung könnte letztlich zu einer Reduktion der Stenose- und Verschlussrate führen.

Ein ebenfalls wichtiger Faktor in der Entstehung der Bypassvaskulopathie ist die Zeit der Zwischenlagerung. Anhand der vorliegenden Arbeit lässt sich erkennen, dass die Apoptoserate im Endothel sowohl in der Via Span- als auch in der Z44-Lösung im Zeitverlauf proportional ansteigt. Die autologen Bypass-Venen sollten so rasch wie möglich nach der Entnahme implantiert werden, um die Entwicklung der Intimahyperplasie zu minimieren.

## 5. Zusammenfassung

In der vorliegenden experimentellen Arbeit wurde anhand humaner venöser Grafts untersucht, inwieweit die Lösungen Z44 und Via Span in der Lage sind, frühischämische Zellschäden in venösen Grafts zu minimieren.

Die Studie umfasste 30 humane Graftproben der Vena saphena magna. Die Graftproben wurden sowohl in der Z44- als auch in der Via Span-Lösung über einen Zeitraum von 90 Minuten konserviert. Nach den Zeitpunkten 30, 60 und 90 Minuten wurde jeweils ein Venenstück aus den Lösungen entnommen und in Formaldehyd fixiert. Anschließend erfolgte im Labor zur immunhistochemischen Auswertung der TUNEL-Test. Hierbei wurden apoptotisch veränderte Zellen detektiert. Die erhobenen Daten wurden mittels der Signifikanzberechnung statistisch ausgewertet.

Die gewonnenen Ergebnisse zeigten sowohl in der Z44- als auch in der Via Span-Lösung, dass in den Schichten Endothel und Adventitia die höchsten Apoptoseraten auftraten.

In der Z44-Lösung stieg die Apoptoserate im Endothel und der Adventitia im zeitlichen Verlauf an. In den Schichten des Subendothels und der Media zeigte sich ebenfalls ein Anstieg der Apoptoserate vom Zeitpunkt 30 Minuten zum Zeitpunkt 60 Minuten. Die Apoptoserate des Zeitpunktes 90 Minuten war in beiden Schichten geringer als zum Zeitpunkt 60 Minuten.

In der Via Span-Lösung lag die Apoptoserate im Endothel zum Zeitpunkt 0 Minuten etwas höher als zum Zeitpunkt 30 Minuten. Zum Zeitpunkt 60 und 90 Minuten stieg sie weiter an. In der Adventitia war eine steigende Apoptoserate im zeitlichen Verlauf zu beobachten. Im Subendothel sank sie vom Zeitpunkt 0 Minuten zum Zeitpunkt 30 Minuten ab. Nach 60 und 90 Minuten stieg die Apoptoserate an und war für beide Zeitpunkte identisch. In der Media war die Apoptoserate für den Zeitpunkt 0 Minuten höher als zum Zeitpunkt 30 Minuten. Zum Zeitpunkt 60 Minuten stieg sie leicht an und fiel dann nach 90 Minuten wieder ab. Die Apoptoserate war in den Venen,



die in der Z44-Lösung konserviert wurden, zu jedem Zeitpunkt und in jeder Gewebsschicht höher als die Venen der Via Span-Lösung.

Anhand der ermittelten Ergebnisse wird ersichtlich, dass sich in den Grafts, die in den Lösungen Z44 und Via Span konserviert wurden, frühischämische Zelltodereignisse finden. Die Apoptoserate ist in der Via Span-Lösung allerdings kleiner als in der Z44-Lösung. Weiterhin lässt sich erkennen, dass die Zeit der Zwischenlagerung eine wichtige Rolle in der Entstehung frühischämischer Zellschäden spielt. Die Apoptoserate im Endothel steigt sowohl in der Via Span- als auch in der Z44-Lösung im zeitlichen Verlauf proportional an.

Die Via Span-Lösung kann einen Gefäßschaden besser abwenden als die Z44-Lösung. Der endotheliale Zellschaden könnte durch die Via Span-Lösung weiter reduziert werden und letztendlich zu einer Reduktion der Stenose- und Verschlussrate führen.

Bemerkenswert scheint die Abhängigkeit der Apoptoserate von der Kaliumkonzentration des Inkubationsmediums zu sein: Je höher die Kaliumkonzentration desto niedriger die Apoptoserate.

## 6. Literaturverzeichnis

- Abebe W, Cavallari N, Agrawal DK, Rowley J, Thorpe PE, Hunter WJ, Edwards JD. Functional and morphological assessment of rat aorta stored in University of Wisconsin and Eurocollins solutions. *Transplantation*. 1993; 56: 808-816
- Adcock OT, Jr., Adcock GL, Wheeler JR, Gregory RT, Snyder SO Jr., Gayle RG. Optimal techniques for harvesting and preparation of reversed autogenous vein grafts for use as arterial substitutes: a review. *Surgery*. 1984; 96: 886-894
- Alamanni F, Parolari A, Visigalli R, Bussolati O, Rubini P, Sala R, Bonati L, Gazzola GC, Biglioli P, Dall'Asta V. Endothelial cell injury induced by preservation solutions: a confocal microscopy study. *Ann Thorac Surg*. 2002; 73: 1606-1614; discussion 14-15
- Allaire E, Clowes AW. Endothelial cell injury in cardiovascular surgery: the intimal hyperplastic response. *Ann Thorac Surg*. 1997; 63: 582-591
- Anastasiou N, Allen S, Paniagua R, Chester A, Yacoub M. Altered endothelial and smooth muscle cell reactivity caused by University of Wisconsin preservation solution in human saphenous vein. *J Vasc Surg*. 1997; 25: 713-721
- Ansari B, Coates PJ, Greenstein BD, Hall PA. In situ end-labelling detects DNA strand breaks in apoptosis and other physiological and pathological states. *J Pathol*. 1993; 170:1-8
- Barner HB, Fischer VW. Endothelial preservation in human saphenous veins harvested for coronary grafting. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1990; 100:148-149
- Belzer FO, Southard JH. Principles of solid-organ preservation by cold storage. *Transplantation*. 1988; 45: 673-676
- Best PJ, Hasdai D, Sangiorgi G, Schwartz RS, Holmes DR, Jr., Simari RD, Lerman A. Apoptosis. Basic concepts and implications in coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1999; 19: 14-22
- Bourassa MG. Fate of venous grafts: the past, the present and the future. *J Am Coll Cardiol*. 1991; 17: 1081-1083
- Bourassa MG, Fisher LD, Campeau L, Gillespie MJ, McConney M, Lesperance J. Long-term fate of bypass grafts: the Coronary Artery Surgery Study (CASS) and Montreal Heart Institute experiences. *Circulation*. 1985; 72: V71-78
- Boyle JJ. Vascular smooth muscle cell apoptosis in atherosclerosis. *Int J Exp Pathol*. 1999; 80: 197-203

Bryan AJ, Angelini GD. The biology of saphenous vein graft occlusion: etiology and strategies for prevention. *Curr Opin Cardiol*. 1994; 9: 641-649

Campeau L, Enjalbert M, Lesperance J, Bourassa MG, Kwiterovich P Jr., Wacholder S, Sniderman A. The relation of risk factors to the development of atherosclerosis in saphenous-vein bypass grafts and the progression of disease in the native circulation. A study 10 years after aorto-coronary bypass surgery. *N Engl J Med*. 1984; 311: 1329-1332

Cavallari N, Abebe W, Mingoli A, Sapienza P, Hunter WJ, 3rd, Agrawal DK, Cavallaro A, Edwards JD. Short-term preservation of autogenous vein grafts: effectiveness of University of Wisconsin solution. *Surgery*. 1997; 121: 64-71

Chang CH, Lin PJ, Chu Y, Lee YS. Impaired endothelium-dependent relaxation after cardiac global ischemia and reperfusion: role of warm blood cardioplegia. *J Am Coll Cardiol*. 1997; 29: 681-687

Cheanvechai C, Effler DB, Hooper JR, Eschenbruch EM, Sheldon WC, Sones FM, Jr., Levin HS, Hawk WA. The structural study of the saphenous vein. *Ann Thorac Surg*. 1975; 20: 636-645

Clarke MC, Figg N, Maguire JJ, Davenport AP, Goddard M, Littlewood TD, Bennett MR. Apoptosis of vascular smooth muscle cells induces features of plaque vulnerability in atherosclerosis. *Nat Med*. 2006; 12: 1075-1080

Clarke MC, Littlewood TD, Figg N, Maguire JJ, Davenport AP, Goddard M, Bennett MR. Chronic apoptosis of vascular smooth muscle cells accelerates atherosclerosis and promotes calcification and medial degeneration. *Circ Res*. 2008; 102: 1529-1538

Compton MM. A biochemical hallmark of apoptosis: internucleosomal degradation of the genome. *Cancer Metastasis Rev*. 1992; 11: 105-119

Cook JM, Cook CD, Marlar R, Solis MM, Fink L, Eidt JF. Thrombomodulin activity on human saphenous vein grafts prepared for coronary artery bypass. *J Vasc Surg*. 1991; 14: 147-151

Cook RC, Crowley CM, Hayden R, Gao M, Fedoruk L, Lichtenstein SV, van Breemen C. Traction injury during minimally invasive harvesting of the saphenous vein is associated with impaired endothelial function. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2004; 127: 65-71

Cox JL, Chiasson DA, Gotlieb AI. Stranger in a strange land: the pathogenesis of saphenous vein graft stenosis with emphasis on structural and functional differences between veins and arteries. *Prog Cardiovasc Dis*. 1991; 34: 45-68

Davies MG, Hagen PO. Pathophysiology of vein graft failure: a review. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 1995; 9: 7-18

Davies MG, Kim JH, Dalen H, Makhoul RG, Svendsen E, Hagen PO. Reduction of experimental vein graft intimal hyperplasia and preservation of nitric oxide-mediated relaxation by the nitric oxide precursor L-arginine. *Surgery*. 1994; 116: 557-568

De Caterina R, Libby P, Peng HB, Thannickal VJ, Rajavashisth TB, Gimbrone MA, Jr., Shin WS, Liao JK. Nitric oxide decreases cytokine-induced endothelial activation. Nitric oxide selectively reduces endothelial expression of adhesion molecules and proinflammatory cytokines. *J Clin Invest.* 1995; 96: 60-68

Dilley RJ, McGeachie JK, Tennant M. Vein to artery grafts: a morphological and histochemical study of the histogenesis of intimal hyperplasia. *Aust N Z J Surg.* 1992; 62: 297-303

Drinkwater DC, Jr., Ziv ET, Laks H, Lee JR, Bhuta S, Rudis E, Chang P. Extracellular and standard University of Wisconsin solutions provide equivalent preservation of myocardial function. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1995; 110: 738-745

Düsterhöft V, Bauer M, Zurbrügg HR, Sängler S, Bauer A, Buz S, Hetzer R. Die traditionelle und die minimal-invasive Saphenektomie in der aortokoronaren Bypasschirurgie-Entwicklung, Systeme, operative Prozedur, Komplikationen. *Zeitschrift für Herz-, Thorax- und Gefäßchirurgie.* 2000; 14: 204-211

Eagle KA, Guyton RA, Davidoff R, Ewy GA, Fonger J, Gardner TJ, Gott JP, Herrmann HC, Marlow RA, Nugent W, O'Connor GT, Orszulak TA, Rieselbach RE, Winters WL, et al. ACC/AHA guidelines for coronary artery bypass graft surgery: executive summary and recommendations : A report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Committee to revise the 1991 guidelines for coronary artery bypass graft surgery). *Circulation.* 1999; 100: 1464-1480

Emmrich K. Aortokoronare Bypass-Operationen-Determinanten für ihre Langzeitergebnisse. *Internist.* 1998; 39: 749-753

Evora PR, Pearson PJ, Schaff HV. Crystalloid cardioplegia and hypothermia do not impair endothelium-dependent relaxation or damage vascular smooth muscle of epicardial coronary arteries. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1992; 104: 1365-1374

Favaloro RG. Saphenous vein graft in the surgical treatment of coronary artery disease. Operative technique. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1969; 58: 178-185

Fitzgibbon GM, Kafka HP, Leach AJ, Keon WJ, Hooper GD, Burton JR. Coronary bypass graft fate and patient outcome: angiographic follow-up of 5,065 grafts related to survival and reoperation in 1,388 patients during 25 years. *J Am Coll Cardiol.* 1996; 28: 616-626

Fox JC, Shanley JR. Antisense inhibition of basic fibroblast growth factor induces apoptosis in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem.* 1996; 271: 12578-12584

Fukuo K, Hata S, Suhara T, Nakahashi T, Shinto Y, Tsujimoto Y, Morimoto S, Ogihara T. Nitric oxide induces upregulation of Fas and apoptosis in vascular smooth muscle. *Hypertension.* 1996; 27: 823-826

Garlicki M. May preservation solution affect the incidence of graft vasculopathy in transplanted heart? *Ann Transplant.* 2003; 8: 19-24

Garrett HE, Dennis EW, DeBakey ME. Aortocoronary bypass with saphenous vein graft. Seven-year follow-up. *Jama*. 1973; 223: 792-794

Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol*. 1992; 119: 493-501

Geng YJ, Wu Q, Muszynski M, Hansson GK, Libby P. Apoptosis of vascular smooth muscle cells induced by in vitro stimulation with interferon-gamma, tumor necrosis factor-alpha, and interleukin-1 beta. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1996; 16: 19-27

Gibbon JH, Jr. Application of a mechanical heart and lung apparatus to cardiac surgery. *Minn Med*. 1954; 37: 171-185; passim

Goldman S, Zadina K, Moritz T, Ovitt T, Sethi G, Copeland JG, Thottapurathu L, Krasnicka B, Ellis N, Anderson RJ, Henderson W. Long-term patency of saphenous vein and left internal mammary artery grafts after coronary artery bypass surgery: results from a Department of Veterans Affairs Cooperative Study. *J Am Coll Cardiol*. 2004; 44: 2149-2156

Gottlob R. The preservation of the venous endothelium by "dissection without touchin" and by an atraumatic technique of vascular anastomosis. The importance for arterial and venous surgery. *Minerva Chir*. 1977 Jun; 32: 693-700

Gundry SR, Jones M, Ishihara T, Ferrans VJ. Optimal preparation techniques for human saphenous vein grafts. *Surgery*. 1980; 88: 785-794

Hassantash SA, Bikdeli B, Kalantarian S, Sadeghian M, Afshar H. Pathophysiology of aorto-coronary saphenous vein bypass graft disease. *Asian Cardiovasc Thorac Ann*. 2008; 16: 331-336

He GW. Hyperkalemia exposure impairs EDHF-mediated endothelial function in the human coronary artery. *Ann Thorac Surg*. 1997; 63: 84-87

He GW, Yang CQ. Hyperkalemia alters endothelium-dependent relaxation through non-nitric oxide and noncyclooxygenase pathway: a mechanism for coronary dysfunction due to cardioplegia. *Ann Thorac Surg*. 1996; 61: 1394-1399

He GW, Yang CQ. Impaired endothelium-derived hyperpolarizing factor-mediated relaxation in coronary arteries by cold storage with University of Wisconsin solution. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1998; 116: 122-130

He GW, Yang CQ, Graier WF, Yang JA. Hyperkalemia alters EDHF-mediated hyperpolarization and relaxation in coronary arteries. *Am J Physiol*. 1996; 271: H760-767

He GW, Yang CQ, Yang JA. Depolarizing cardiac arrest and endothelium-derived hyperpolarizing factor-mediated hyperpolarization and relaxation in coronary arteries: the effect and mechanism. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1997; 113: 932-941

Ingemansson R, Sjoberg T, Massa G, Steen S. Long-term preservation of vascular endothelium and smooth muscle. *Ann Thorac Surg.* 1995; 59: 1177-1181

Kajihara N, Morita S, Tanoue Y, Boku N, Eto M, Nishida T, Tominaga R. The UW solution has greater potential for longer preservation periods than the Celsior solution: comparative study for ventricular and coronary endothelial function after 24-h heart preservation. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2006; 29: 784-789

Kalan JM, Roberts WC. Morphologic findings in saphenous veins used as coronary arterial bypass conduits for longer than 1 year: necropsy analysis of 53 patients, 123 saphenous veins, and 1865 five-millimeter segments of veins. *Am Heart J.* 1990; 119: 1164-1184

Kerr JF. A histochemical study of hypertrophy and ischaemic injury of rat liver with special reference to changes in lysosomes. *J Pathol Bacteriol.* 1965; 90: 419-435

Kolessov VI. Mammary artery-coronary artery anastomosis as method of treatment for angina pectoris. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1967; 54: 535-544

Kukreja RC, Hess ML. The oxygen free radical system: from equations through membrane-protein interactions to cardiovascular injury and protection. *Cardiovasc Res.* 1992; 26: 641-655

Labat-Moleur F, Guillermet C, Lorimier P, Robert C, Lantuejoul S, Brambilla E, Negoescu A. TUNEL apoptotic cell detection in tissue sections: critical evaluation and improvement. *J Histochem Cytochem.* 1998; 46: 327-334

Lane DP. Cancer. A death in the life of p53. *Nature.* 1993; 362: 786-787

Lauber K, Engels IH, Wesselborg S. Apoptose-Prinzipien der Apoptosesignaltransduktion. *Onkologie.* 2004; 10: 58-61

Lee J, Drinkwater DC, Jr., Laks H, Chong A, Blitz A, Chen MA, Ignarro LJ, Chang P. Preservation of endothelium-dependent vasodilation with low-potassium University of Wisconsin solution. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1996; 112: 103-110

Li D, Yang B, Mehta JL. Tumor necrosis factor- $\alpha$  enhances hypoxia-reoxygenation-mediated apoptosis in cultured human coronary artery endothelial cells: critical role of protein kinase C. *Cardiovasc Res.* 1999; 42: 805-813

Longo M, Jain V, Vedernikov YP, Facchinetti F, Saade GR, Garfield RE. Endothelium dependence and gestational regulation of inhibition of vascular tone by magnesium sulfate in rat aorta. *Am J Obstet Gynecol.* 2001; 184: 971-978

Luscher TF. Vascular biology of coronary bypass grafts. *Curr Opin Cardiol.* 1991; 6: 868-876

Luscher TF, Tanner FC, Tschudi MR, Noll G. Endothelial dysfunction in coronary artery disease. *Annu Rev Med.* 1993; 44: 395-418

- Majno G, Joris I. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am J Pathol.* 1995; 146: 3-15
- Mankad P, Slavik Z, Yacoub M. Endothelial dysfunction caused by University of Wisconsin preservation solution in the rat heart. The importance of temperature. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1992; 104: 1618-1624
- Mankad PS, Chester AH, Yacoub MH. Role of potassium concentration in cardioplegic solutions in mediating endothelial damage. *Ann Thorac Surg.* 1991; 51: 89-93
- Menasche P, Termignon JL, Pradier F, Grousset C, Mouas C, Alberici G, Weiss M, Piwnica A, Bloch G. Experimental evaluation of Celsior, a new heart preservation solution. *Eur J Cardiothorac Surg.* 1994; 8: 207-213
- Moor E, Hamsten A, Blomback M, Herzfeld I, Wiman B, Ryden L. Haemostatic factors and inhibitors and coronary artery bypass grafting: preoperative alterations and relations to graft occlusion. *Thromb Haemost.* 1994; 72: 335-342
- Motwani JG, Topol EJ. Aortocoronary saphenous vein graft disease: pathogenesis, predisposition, and prevention. *Circulation.* 1998; 97: 916-931
- Nachman RL, Silverstein R. Hypercoagulable states. *Ann Intern Med.* 1993; 119: 819-827
- Nguyen HC, Grossi EA, LeBoutillier M, 3rd, Steinberg BM, Rifkin DB, Baumann FG, Colvin SB, Galloway AC. Mammary artery versus saphenous vein grafts: assessment of basic fibroblast growth factor receptors. *Ann Thorac Surg.* 1994; 58: 308-310; discussion 10-11
- Nishio E, Fukushima K, Shiozaki M, Watanabe Y. Nitric oxide donor SNAP induces apoptosis in smooth muscle cells through cGMP-independent mechanism. *Biochem Biophys Res Commun.* 1996; 221: 163-168
- Ogawa S, Gerlach H, Esposito C, Pasagian-Macaulay A, Brett J, Stern D. Hypoxia modulates the barrier and coagulant function of cultured bovine endothelium. Increased monolayer permeability and induction of procoagulant properties. *J Clin Invest.* 1990; 85: 1090-1098
- Parolari A, Rubini P, Cannata A, Bonati L, Alamanni F, Tremoli E, Biglioli P. Endothelial damage during myocardial preservation and storage. *Ann Thorac Surg.* 2002; 73: 682-690
- Pober JS, Cotran RS. Cytokines and endothelial cell biology. *Physiol Rev.* 1990; 70: 427-451
- Pollman MJ, Yamada T, Horiuchi M, Gibbons GH. Vasoactive substances regulate vascular smooth muscle cell apoptosis. Countervailing influences of nitric oxide and angiotensin II. *Circ Res.* 1996; 79: 748-756
- Radomski MW, Palmer RM, Moncada S. An L-arginine/nitric oxide pathway present in human platelets regulates aggregation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990; 87: 5193-5197

- Rao GN, Berk BC. Active oxygen species stimulate vascular smooth muscle cell growth and proto-oncogene expression. *Circ Res.* 1992; 70: 593-599
- Ratliff NB, Myles JL. Rapidly progressive atherosclerosis in aortocoronary saphenous vein grafts. Possible immune-mediated disease. *Arch Pathol Lab Med.* 1989; 113: 772-776
- Rinaldi M, Martinelli L, Volpato G, Minzioni G, Goggi C, Mantovani V, Vigano M. University of Wisconsin solution provides better lung preservation in human lung transplantation. *Transplant Proc.* 1995; 27: 2869-2871
- Ross R. Cell biology of atherosclerosis. *Annu Rev Physiol.* 1995; 57: 791-804
- Shafi S, Palinski W, Born GV. Comparison of uptake and degradation of low density lipoproteins by arteries and veins of rabbits. *Atherosclerosis.* 1987; 66: 131-138
- Shuhaiber JH, Evans AN, Massad MG, Geha AS. Mechanisms and future directions for prevention of vein graft failure in coronary bypass surgery. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2002; 22: 387-396
- Solberg S, Larsen T, Smabrekke A, Brox JH, Bertheussen K, Sorlie D, Osterud B, Jorgensen L. A new protective solution for hypothermic storage of free vein grafts in cardiovascular surgery. *Scand J Clin Lab Invest.* 1992; 52: 73-82
- Sorajja P, Cable DG, Schaff HV. Hypothermic storage with University of Wisconsin solution preserves endothelial and vascular smooth-muscle function. *Circulation.* 1997; 96(9 Suppl):II-297-302; discussion II--3
- Stanke-Labesque F, Cracowski JL, Devillier P, Caron F, Bessard G. Functional assessment of rat aorta after cold storage in different media. *Fundam Clin Pharmacol.* 1999; 13: 310-319
- Stanley JC, Ernst CB, Fry WJ. Fate of 100 aortorenal vein grafts: characteristics of late graft expansion, aneurysmal dilatation, and stenosis. *Surgery.* 1973; 74: 931-944
- Stempien-Otero A, Karsan A, Cornejo CJ, Xiang H, Eunson T, Morrison RS, Kay M, Winn R, Harlan J. Mechanisms of hypoxia-induced endothelial cell death. Role of p53 in apoptosis. *J Biol Chem.* 1999 Mar; 274: 8039-8045
- Swanson DK, Pasaoglu I, Berkoff HA, Southard JA, Hegge JO. Improved heart preservation with UW preservation solution. *J Heart Transplant.* 1988; 7: 456-467
- Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science.* 1995; 267: 1456-1462
- Tineli RA, Viaro F, Dalio MB, Reis GS, Basseto S, Vicente WV, Rodrigues AJ, Evora PR. Mechanical forces and human saphenous veins: coronary artery bypass graft implications. *Rev Bras Cir Cardiovasc.* 2007; 22: 87-95
- Tretyakov AV, Farber HW. Endothelial cell tolerance to hypoxia. Potential role of purine nucleotide phosphates. *J Clin Invest.* 1995; 95: 738-744



- Tsui JC, Souza DS, Filbey D, Bomfim V, Dashwood MR. Preserved endothelial integrity and nitric oxide synthase in saphenous vein grafts harvested by a 'no-touch' technique. *Br J Surg*. 2001; 88: 1209-1215
- Verrier ED, Boyle EM, Jr. Endothelial cell injury in cardiovascular surgery. *Ann Thorac Surg*. 1996; 62: 915-922
- Wagner R. Intimal protection of bypass-veins during intraoperative storage in blood or Euro-Collins-solution: the role of medium, temperature, and time. *Thorac Cardiovasc Surg*. 1990; 38: 151-156
- Wahlberg JA, Southard JH, Belzer FO. Development of a cold storage solution for pancreas preservation. *Cryobiology*. 1986; 23: 477-482
- Weiss SJ. Tissue destruction by neutrophils. *N Engl J Med*. 1989; 320: 365-376
- Yang Q, He GW. Effect of cardioplegic and organ preservation solutions and their components on coronary endothelium-derived relaxing factors. *Ann Thorac Surg*. 2005; 80: 757-767
- Yang ZW, Gebrewold A, Nowakowski M, Altura BT, Altura BM. Mg(2+)-induced endothelium-dependent relaxation of blood vessels and blood pressure lowering: role of NO. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2000; 278: R628-639
- Zamai L, Falcieri E, Marhefka G, Vitale M. Supravital exposure to propidium iodide identifies apoptotic cells in the absence of nucleosomal DNA fragmentation. *Cytometry*. 1996; 23: 303-311
- Zerkowski HR, Knocks M, Konerding MA, Doetsch N, Roth G, Hakim K, Reidemeister JC. Endothelial damage of the venous graft in CABG. Influence of solutions used for storage and rinsing on endothelial function. *Eur J Cardiothorac Surg*. 1993; 7: 376-382

## **7. Danksagung**

Herrn Professor Dr. C. J. Preuße, Klinik und Poliklinik für Herzchirurgie der Universität Bonn, danke ich sowohl für die Ermöglichung und Begleitung der vorliegenden Promotionsarbeit als auch für die konstruktive Kritik bei der Entstehung dieser Arbeit.

Für die wissenschaftliche Betreuung, die tatkräftige Unterstützung und sein Engagement danke ich besonders Herrn Dr. K. Winkler.

Der medizinisch-technischen Assistentin Frau C. Peigney möchte ich für die ausgezeichnete Einarbeitung ins herzchirurgischen Labor, die gewissenhafte Arbeit, die gute Unterstützung sowie die stets freundliche und kollegiale Zusammenarbeit im Rahmen der experimentellen Arbeit danken.

Zuletzt danke ich meiner Familie, insbesondere meiner Schwester, die diese Arbeit gewissenhaft lektoriert und mich motiviert und ausnahmslos unterstützt hat.